

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-12072

(P2019-12072A)

(43) 公開日 平成31年1月24日(2019.1.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A N
<b>GO 1 N 37/00</b> (2006.01)	GO 1 N 37/00	D
<b>C 4 O B 40/10</b> (2006.01)	C 4 O B 40/10	1 0 2

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 71 頁)

(21) 出願番号	特願2018-153487 (P2018-153487)	(71) 出願人	514247702
(22) 出願日	平成30年8月17日 (2018. 8. 17)		アリゾナ ボード オブ リージェンツ
(62) 分割の表示	特願2015-530060 (P2015-530060)		ア ボディ コーポレート オブ ザ ス
	の分割		テイト オブ アリゾナ アクティング
原出願日	平成25年8月29日 (2013. 8. 29)		フォー アンド オン ビハーフ オブ
(31) 優先権主張番号	61/694, 598		アリゾナ ステイト ユニバーシティー
(32) 優先日	平成24年8月29日 (2012. 8. 29)		ARIZONA BOARD OF RE
(33) 優先権主張国	米国 (US)		GENTS, A BODY CORPO
			RATE OF THE STATE O
			F ARIZONA ACTING FO
			R AND ON BEHALF OF
			ARIZONA STATE UNIVE
			RSITY
			アメリカ合衆国 アリゾナ州 85257
			-3538 スコットズデール ノース ス
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫署名：早期診断および健康モニタリングの方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】健康モニタリング、診断、処置および予防医療のための有効な方法およびアレイを提供する。

【解決手段】健康モニタリング方法であって、a)複合的生体試料とペプチドアレイを接触させ、ここで、ペプチドアレイは生体試料中の少なくとも1種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、b)抗体の複数のペプチドアレイ中の異なるペプチドに対するオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成させ、そして、c)免疫署名と健康状態を関連させる手順を含む、方法。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

健康モニタリング方法であって、

- a) 複合的生体試料とペプチドアレイを接触させ、ここで、該ペプチドアレイは該生体試料中の少なくとも 1 種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、
  - b) 抗体の複数のペプチドアレイ中の異なるペプチドに対するオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成させ、そして
  - c) 免疫署名と健康状態を関連させる
- 手順を含む、方法。

## 【請求項 2】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 8 ~ 35 残基長である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 15 ~ 25 残基長である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 2 ~ 4 nm の範囲の平均的間隙を有する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 3 ~ 6 nm の範囲の平均的間隙を有する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

異なるペプチドが分子に約  $10^3 \text{ M}^{-1}$  の結合定数で結合する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

異なるペプチドが分子に  $10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

異なるペプチドが分子に  $2 \times 10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

異なるペプチドが分子に  $10^4 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

異なるペプチドがペプチド模倣物を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

異なるペプチドが無作為アミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

異なるペプチドが非天然アミノ酸を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

処置を提供する方法であって、

- a) 対象から複合的生体試料を得て、
  - b) 複合的生体試料をペプチドアレイと接触させ、ここで、該ペプチドアレイは該生体試料中の少なくとも 1 種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、
  - c) 抗体の種々の複数の異なるペプチドに対するオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成させ、
  - d) 免疫署名と状態を関連させ、そして
  - e) 状態に処置を提供する
- 手順を含む、方法。

## 【請求項 14】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 8 ~ 35 残基長である、請求項 13 に記載の方法

10

20

30

40

50

。

## 【請求項 15】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 15 ~ 25 残基長である、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 16】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 2 ~ 4 nm の範囲の平均的間隙を有する、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 17】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 3 ~ 6 nm の範囲の平均的間隙を有する、請求項 13 に記載の方法。

10

## 【請求項 18】

異なるペプチドが分子に約  $10^3 \text{ M}^{-1}$  の結合定数で結合する、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 19】

異なるペプチドが分子に  $10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 20】

異なるペプチドが分子に  $2 \times 10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 21】

異なるペプチドが分子に  $10^4 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、請求項 13 に記載の方法。

20

## 【請求項 22】

異なるペプチドがペプチド模倣物を含む、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 23】

異なるペプチドが無作為アミノ酸配列を有する、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 24】

異なるペプチドが非天然アミノ酸を含む、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 25】

状態の予防方法であって、

30

a) 対象から複合的生体試料を得て、

b) 複合的生体試料をペプチドアレイと接触させ、ここで、該ペプチドアレイは複合的生体試料中の少なくとも 1 種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、

c) 抗体の種々の複数の異なるペプチドに対するオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成させ、

d) 免疫署名と状態を関連させ、そして

e) 状態の処置を受ける

手順を含む、方法。

## 【請求項 26】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 8 ~ 35 残基長である、請求項 25 に記載の方法

40

。

## 【請求項 27】

ペプチドマイクロアレイ上の異なるペプチドが 15 ~ 25 残基長である、請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 28】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 2 ~ 4 nm の範囲の平均的間隙を有する、請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 29】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 3 ~ 6 nm の範囲の平均的間隙を有する、請求項 25 に記載の方法。

50

## 【請求項 30】

異なるペプチドが分子に約  $10^3 \text{ M}^{-1}$  の結合定数で結合する、請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 31】

異なるペプチドが分子に  $10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 32】

異なるペプチドが分子に  $2 \times 10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 33】

異なるペプチドが分子に  $10^4 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 34】

異なるペプチドがペプチド模倣物を含む、請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 35】

異なるペプチドが無作為アミノ酸配列を有する、請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 36】

異なるペプチドが非天然アミノ酸を含む、請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 37】

診断方法であって、

- a) 対象から複合的生体試料を得て、
- b) 複合的生体試料をペプチドアレイと接触させ、ここで、該ペプチドアレイは該生体試料中の少なくとも 1 種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、
- c) 抗体のペプチドアレイ上の一群の異なるペプチドに対するオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成し、そして
- d) 免疫署名に基づき状態を診断することを含む、方法。

## 【請求項 38】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 8 ~ 35 残基長である、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 39】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 15 ~ 25 残基長である、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 40】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 2 ~ 4 nm の範囲の平均的間隙を有する、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 41】

ペプチドアレイ上の異なるペプチドが 3 ~ 6 nm の範囲の平均的間隙を有する、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 42】

異なるペプチドが分子に約  $10^3 \text{ M}^{-1}$  の結合定数で結合する、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 43】

異なるペプチドが分子に  $10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 44】

異なるペプチドが分子に  $2 \times 10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 45】

異なるペプチドが分子に  $10^4 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、請求項 3

10

20

30

40

50

7に記載の方法。

【請求項46】

異なるペプチドがペプチド模倣物を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項47】

異なるペプチドが無作為アミノ酸配列を有する、請求項37に記載の方法。

【請求項48】

異なるペプチドが一パラトープに結合する、請求項37に記載の方法。

【請求項49】

固体支持体上の様々な位置に固定化された多様な長さの複数のインサイツ合成ポリマーを含むアレイであって、ポリマーのインサイツ合成が

- a. 固体支持体上の位置の予定した画分に第一モノマーを付加し、
- b. 固体支持体上の位置の予定した画分に第二モノマーを付加し、ここで、第二モノマーの位置の予定した画分は第一モノマーを含む位置およびモノマーがない位置を含み、
- c. 固体支持体上の位置の予定した画分に第三モノマーを付加し、ここで、第二モノマーの位置の予定した画分は第一および第二モノマーを含む位置、第二モノマーを含む位置およびモノマーを含まない位置を含み、そして
- d. ポリマーが所望の平均長に達し、画分の和が少なくとも計100%になるまで、定義された一連のモノマーを用いて手順a～cを繰り返す工程を含む、アレイ。

10

【請求項50】

疑似無作為アレイである、請求項49に記載のアレイ。

20

【請求項51】

無作為アレイである、請求項49に記載のアレイ。

【請求項52】

モノマーがアミノ酸、核酸およびペプチド核酸からなる群から選択される、請求項49に記載のアレイ。

【請求項53】

定義された一連のモノマーにおけるモノマーが1回以上出現する、請求項49に記載のアレイ。

【請求項54】

定義された一連のモノマーにおける異なるモノマーの数が少なくとも2である、請求項49に記載のアレイ。

30

【請求項55】

ポリマーが少なくとも10残基の平均長を有する、請求項49に記載のアレイ。

【請求項56】

ポリマーが少なくとも12残基の平均長を有する、請求項49に記載のアレイ。

【請求項57】

ポリマーが少なくとも5残基の平均長を有する、請求項49に記載のアレイ。

【請求項58】

ポリマーの少なくとも5%が少なくとも12残基の長さを有する、請求項49に記載のアレイ。

40

【請求項59】

ポリマーが試料の成分に結合できる、請求項49に記載のアレイ。

【請求項60】

画分の和が計100%である、請求項49に記載のアレイ。

【請求項61】

画分の和が100%より大きい、請求項49に記載のアレイ。

【請求項62】

ポリマー数が3,000より大きい、請求項49に記載のアレイ。

【請求項63】

50

ポリマー数が 10,000 より大きい、請求項 49 に記載のアレイ。

【請求項 64】

ポリマー数が 100,000 より大きい、請求項 49 に記載のアレイ。

【請求項 65】

ポリマー数が 330,000 より大きい、請求項 49 に記載のアレイ。

【請求項 66】

固体支持体上の様々な位置に固定化された多様な長さの複数のインサイツ合成ポリマーを含むアレイを組み立てる方法であって、

a. ポリマーを合成する場所である固体支持体として基質を提供し、

b. 固体支持体上の位置の予定した画分に第一モノマーを付加し、

c. 固体支持体上の位置の予定した画分に第二モノマーを付加し、ここで、第二モノマーの位置の予定した画分は第一モノマーを含む位置およびモノマーがない位置を含み、

d. 固体支持体上の位置の予定した画分に第三モノマーを付加し、ここで、第三モノマーの位置の予定した画分は第一および第二モノマーを含む位置、第二モノマーを含む位置およびモノマーを含まない位置を含み、そして

e. ポリマーが所望の平均長に達し、画分の和が少なくとも計 100% になるまで、定義された一連のモノマーを用いて手順 b ~ d を繰り返す工程を含む、

方法。

【請求項 67】

疑似無作為アレイである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

無作為アレイである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 69】

モノマーがアミノ酸、核酸およびペプチド核酸からなる群から選択される、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 70】

定義された一連のモノマーにおけるモノマーが 1 回以上出現する、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 71】

定義された一連のモノマーにおける異なるモノマーの数が少なくとも 2 である、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 72】

ポリマーが少なくとも 10 残基の平均長を有する、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 73】

ポリマーが少なくとも 12 残基の平均長を有する、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 74】

ポリマーが少なくとも 5 残基の平均長を有する、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 75】

ポリマーの少なくとも 5% が少なくとも 12 残基の長さを有する、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 76】

ポリマーが試料の成分に結合できる、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 77】

画分の和が計 100% である、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 78】

画分の和が 100% より大きい、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 79】

ポリマー数が 3,000 より大きい、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 80】

ポリマー数が 10,000 より大きい、請求項 66 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 8 1】

ポリマー数が 1 0 0 , 0 0 0 より大きい、請求項 6 6 に記載の方法。

## 【請求項 8 2】

ポリマー数が 3 3 0 , 0 0 0 より大きい、請求項 6 6 に記載の方法。

## 【請求項 8 3】

アレイを対象の健康状態をモニタリングに使用する方法であって、

- a) 複合的生体試料と請求項 4 9 ~ 6 5 のいずれかに記載のペプチドアレイを接触させ、
- b) 抗体の複数のペプチドアレイ中の異なるペプチドに対するオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成させ、そして
- c) 免疫署名と健康状態を関連させる

10

手順を含む、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

## 相互参照

本出願は、2 0 1 2 年 8 月 2 9 日出願の“免疫署名：早期診断および健康モニタリングの方法”なる名称の米国仮出願番号 6 1 / 6 9 4 , 5 9 8 の利益を主張し、これを引用によりその全体を本明細書に包含させる。

## 【0 0 0 2】

本明細書に記載する全ての刊行物、特許および特許出願は、個々の刊行物、特許および特許出願が具体的にかつ個々に引用により取り込まれることが明示されている場合と同様に引用によって本明細書に包含される。

20

## 【背景技術】

## 【0 0 0 3】

## 背景

健康のモニタリングは大きな課題である。ある状態の早期発見は疾患の予後に大きく影響し得るにもかかわらず、ほとんどの状態について、主症状の出現前に疾患を検出できる単一検査は存在しない。多くのグループが、特定の状態を診断できるアッセイの開発を試みているが、このようなアッセイは特定の疾患または診断に限られている。さらに、長期間にわたる健康のモニタリングは、現在利用可能な診断アッセイでは費用のおよび時間的に無理がある。

30

## 【発明の概要】

## 【0 0 0 4】

## 発明の概要

ここに開示されるのは、対象の健康をモニタリングするための方法、アレイおよびキットである。ここに開示する態様において、本発明は、長期間にわたり個々の健康のモニタリングを可能にする、健康モニタリングの迅速で、確実に、再現可能な方法を提供する。ある態様において、本方法は、a) 複合的生体試料をペプチドアレイと接触させ、ここで、該ペプチドアレイは該生体試料中の少なくとも 1 種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、b) 該抗体のペプチドアレイ中の複数の異なるペプチドとのオフターゲット結合を測定して免疫署名 (immunosignature) を形成し、そして c) 該免疫署名と健康状態を関連させることを含む。

40

## 【0 0 0 5】

ある態様において、本発明は、処置を提供する方法を提供し、該方法は、a) 対象から複合的生体試料を入手し、b) 該複合的生体試料をペプチドアレイと接触させ、ここで、該ペプチドアレイは該生体試料中の少なくとも 1 種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、c) 該抗体の複数の異なるペプチドへのオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成し、d) 該免疫署名と状態を関連させ、そして e) 該状態に対する処置を提供することを含む。

## 【0 0 0 6】

50

ある態様において、本発明は、状態の予防方法を提供し、該方法は、a) 対象から複合的生体試料を得て、b) 該複合的生体試料をペプチドアレイと接触させ、ここで、該ペプチドアレイは複合的生体試料中の少なくとも1種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、c) 該複合的生体試料の複数の異なるペプチドへのオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成し、d) 該免疫署名と状態を関連させ、そしてe) 該状態のための処置を提供することを含む。

【0007】

ある態様において、本発明は診断方法を提供し、該方法は、a) 対象から複合的生体試料を入手し、b) 該複合的生体試料をペプチドアレイと接触させ、ここで、該ペプチドアレイは該生体試料中の少なくとも1種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、c) 該抗体のペプチドアレイ中の複数の異なるペプチドとのオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成し、そしてd) 該免疫署名に基づき状態を診断することを含む。

10

【0008】

ある態様において、本発明は、対象からの生体試料を入手し、記録し、そして希釈するシステムを提供する。ある態様において、対象からの生物学的システムを入手し、記録し、そして希釈するシステムは完全自動化されている。

【0009】

ある態様において、免疫署名システムは、1) 対象からの生体試料を入手し、記録し、希釈するための自動化システム；2) 免疫署名アッセイがa) 希釈試料のペプチドアレイへの適用、b) 一定時間のインキュベーション、c) 未結合試料の洗浄および除去、d) 二次抗体の一定時間の適用、e) 二次抗体の除去およびf) 各スポットの蛍光を決定するためのアレイの乾燥および走査を含むものである、自動化免疫署名アッセイのための区画および3) 検出器により蛍光を検出する；各コンポーネントを含む自動化デバイスを含む。

20

【0010】

ここに記載する免疫署名アッセイと結合させて使用し得る新規アレイの作製のための方法およびデバイスが、ここに提供される。ある態様において、アレイは、アレイ上のヘテロポリマーを作製するためのパターンニング工程数を減らすために製造される。他の態様において、ここに開示する方法およびデバイスは、同時に複数モノマーを付加するための新規パターンニングアルゴリズムを利用する。ある態様において、ここに開示するアルゴリズムは、大きなアレイの合成に必要なパターンニング工程数を顕著に減少し、原価低減および製造時間短縮を実現する。

30

【0011】

ある態様において、ここに開示する方法およびデバイスは、固体支持体上の異なる位置に固定化された多様な長さの複数のインサイト合成ポリマーを含むアレイを提供し、ここで、ポリマーのインサイト合成は、固体支持体上の位置の予定した画分に第一モノマーを付加し、固体支持体上の位置の予定した画分に第二モノマーを付加し、ここで、第二モノマーの位置の予定した画分は第一モノマーを含む位置およびモノマーがない位置を含み、固体支持体上の位置の予定した画分に第三モノマーを付加し、ここで、第三モノマーの位置の予定した画分は第一および第二モノマーを含む位置、第二モノマーを含む位置およびモノマーを含まない位置を含み、そして、ポリマーが所望の平均長に達し、画分の和が少なくとも計100%になるまで、定義された一連のモノマーを用いて工程a~cを繰り返す手順を含む。

40

【0012】

他の態様において、ここに開示する方法およびデバイスはまた固体支持体上の異なる位置に固定化された多様な長さの複数のインサイト合成ポリマーを含むアレイを製造する方法を提供し、該方法は、ポリマーを合成する場所である固体支持体として基質を提供し、固体支持体上の位置の予定した画分に第一モノマーを付加し、固体支持体上の位置の予定した画分に第二モノマーを付加し、ここで、第二モノマーの位置の予定した画分は第一モ

50

ノマーを含む位置およびモノマーがない位置を含み、固体支持体上の位置の予定した画分に第三モノマーを付加し、ここで、第三モノマーの位置の予定した画分は第一および第二モノマーを含む位置、第二モノマーを含む位置およびモノマーを含まない位置を含み、そして、ポリマーが所望の平均長に達し、画分の和が少なくとも計100%になるまで、定義された一連のモノマーを用いて工程b~dを繰り返す手順を含む。

【0013】

さらに他の態様において、ここに開示する方法およびデバイスは、対象の健康状態をモニタリングするためにここに記載するアレイを使用する方法を提供し、該方法は、対象から生体試料を採取し、該生体試料と該アレイをハイブリダイズし、該アレイとハイブリダイズする該試料中の成分を決定し、ハイブリダイゼーションの程度を評価し、そして該対象の健康状態を決定する手順を含む。開示したアレイは、ここに記載した免疫署名の作製に使用できるが、また複合的生体試料中の標的の結合活性を測定するためにマイクロチップアレイを利用する他の診断および治療アッセイにも使用できる。

10

【0014】

ある態様において、本発明はキットを提供する。キットは、対象から少量採血するための指穿刺デバイスおよび血液試料捕集のための受入表面を含む。ある態様において、本キットは、その使用のための指示書を含む。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】試験番号1の相対的群間および群内差異の視覚表示である。120個のペプチドおよび120名の患者試料の各々の値をプロットし、青色は低結合を示し、赤色は高結合を示す。類似度の指標としてユークリッド距離を使用した階層的クラスタリングを使用して、ペプチド(Y軸)および患者(X軸)をクラスター化した。左端への階層はこのクラスタリングに基づく。

20

【0016】

【図2】試験番号1からの試料のヒートマップを示す。パネルAは、120種の選択された特性を使用するトレーニングデータ集合のヒートマップを示す。パネルBは、同じ120個のペプチドを使用してクラスター化した非混合試験データを示す。

【0017】

【図3】試験番号2からの試料のヒートマップを示す。1516個の試料(X軸)を、255個の予測ペプチド(Y軸)の各々の値と共に示す。各疾患を括弧内に示す患者総数と共に記載する。

30

【0018】

【図4】試験番号1の受信者動作特性(ROC)曲線のグラフ表示である。試験番号1からの試験データの各疾患コホートについて、感受性および特異性を計算した。別々のROC曲線を描き、曲線下面積(AUC)値を各分類アルゴリズムに対して各疾患毎に計算した。SVMのAUCを灰色で示す。パネルAは、乳癌のSVMグラフについての特異性/感受性AUCのグラフ表示である。パネルBは、脳の癌のSVMグラフについての特異性/感受性AUCのグラフ表示である。パネルCは、食道癌のSVMグラフについての特異性/感受性AUCのグラフ表示である。パネルDは、多発性骨髄腫のSVMグラフについての特異性/感受性AUCのグラフ表示である。パネルEは、健常対照のSVMグラフについての特異性/感受性AUCのグラフ表示である。パネルFは、膀胱癌についてのSVMグラフの特異性/感受性AUCのグラフ表示である。

40

【0019】

【図5】試験番号1の受信者動作特性(ROC)曲線のグラフ表示である。PCAの曲線下面積(AUC)を灰色で示す。パネルAは、乳癌のPCAグラフについての特異性/感受性AUCのグラフ表示である。パネルBは、脳の癌のPCAグラフについての特異性/感受性AUCのグラフ表示である。パネルCは、食道癌についてのPCAグラフの特異性/感受性AUCのグラフ表示である。パネルDは、多発性骨髄腫についてのPCAグラフの特異性/感受性AUCのグラフ表示である。パネルEは、健常対照についてのPCAグラフ

50

の特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネル F は、膵癌についての PCA グラフの特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。

【0020】

【図6】試験番号1の受信者動作特性(ROC)曲線のグラフ表示である。NBの曲線下面積(AUC)を灰色で示す。パネルAは、乳癌のNBグラフについての特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルBは、脳の癌のNBグラフについての特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルCは、食道癌のNBグラフについての特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルDは、多発性骨髄腫のNBグラフについての特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルEは、健常対照のNBグラフについての特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルFは、膵癌についてのNBグラフの特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。

10

【0021】

【図7】試験番号1の受信者動作特性(ROC)曲線のグラフ表示である。LDAの曲線下面積(AUC)を灰色で示す。パネルAは、乳癌についてのLDAグラフの特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルBは、脳の癌についてのLDAグラフの特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルCは、食道癌についてのLDAグラフの特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルDは、多発性骨髄腫についてのLDAグラフの特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルEは、健常対照についてのLDAグラフの特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルFは、膵癌についてのLDAグラフの特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。

20

【0022】

【図8】試験番号1の受信者動作特性(ROC)曲線のグラフ表示である。k-NNの曲線下面積(AUC)を灰色で示す。パネルAは、乳癌についてのk-NNグラフの特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルBは、脳の癌についてのk-NNグラフの特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルCは、食道癌についてのk-NNグラフの特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルDは、多発性骨髄腫についてのk-NNグラフの特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルEは、健常対照についてのk-NNグラフの特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。パネルFは、膵癌についてのk-NNグラフの特異性 / 感受性 AUC のグラフ表示である。

30

【0023】

【図9】4個の分類器のグラフ表示である。パネルAはPCAのグラフ表示であり、最初の2個の主成分をプロットする。パネルBはLDAのグラフ表示であり、X軸およびY軸は、上位2個の線形判別子を示す。パネルCはNBのグラフ表示であり、予測変数をプロットする。パネルDはk-NNのグラフ表示であり、グループワイズ距離をプロットする。

【0024】

【図10】試験番号2からの255個の分類器ペプチドのうち3個の線グラフである。この強度プロファイルは、X軸に個々を示し、Y軸に各ペプチドについて空間およびlog<sub>10</sub>強度で分けた疾患を示す。パネルAは、疾患6および9について高く、他に対して低いペプチドの線グラフを示す。パネルBは、疾患11に対して高いペプチドの線グラフを示す。パネルCは、疾患1および疾患9の一部に対して高いペプチドを示す。

40

【0025】

【図11】本発明の例示態様に関して使用できるコンピューター・システムの第一例アーキテクチャを示すブロック図である。

【0026】

【図12】本発明の例示態様に関して使用できるコンピューター・ネットワークを示す略図である。

【0027】

【図13】本発明の例示態様に関して使用できるコンピューター・システムの第二例アーキテクチャを示すブロック図である。

50

【0028】

【図14】特徴的ペプチド密度を有する本発明のアレイ例を示す。

【0029】

【図15】インフルエンザワクチン接種後の長期間にわたる複数対象の免疫署名プロファイルを示すヒートマップである。

【0030】

【図16】免疫署名結合パターンを示すヒートマップである。パネルAは、1日を通した同じ対象由来の異なる生体試料の免疫署名を示す。パネルBは、パネルAの一部の拡大図である。

【0031】

【図17】数ヶ月にわたりモニタリングした1対象の免疫署名結合パターンを示すヒートマップである。

【0032】

【図18】21日間にわたる3対象の免疫署名結合パターンを示すヒートマップである。パネルAは、IgM免疫グロブリンの結合が検出されたときの約10,000個のペプチドでのペプチドマイクロアレイのクラスタリングを示す。パネルBは、IgM免疫グロブリンの結合が検出されたときの50名のペプチドでのペプチドマイクロアレイのクラスタリングを示す。パネルCは、IgG免疫グロブリンの結合が検出されたときの約10,000個のペプチドでのペプチドマイクロアレイのクラスタリングを示す。パネルDは、IgG免疫グロブリンの結合が検出されたときの50名のペプチドでのペプチドマイクロアレイのクラスタリングを示す。

【0033】

【図19】免疫署名結合パターン解析を用いる2名の対象の30日間健康モニタリング解析を示すヒートマップである。

【0034】

【図20】17日目に単回インフルエンザワクチンを受けた対象の30日間の経時的な免疫署名結合パターンを示すヒートマップである。22個の選択したペプチド配列に対する対象の免疫署名結合プロファイルの特徴的時間枠にわたり示す。

【0035】

【図21】図20により特徴付けられる対象の2013年3月5日の気管支炎の診断を示すヒートマップである。

【0036】

【図22】図20により特徴付けられる対象の2011年12月11日のインフルエンザの症状後診断を示すヒートマップである。

【0037】

【図23】肝炎ワクチンでの処置およびその3ヶ月後に最初のブースター処置を受けた対象の免疫署名結合パターンを示すヒートマップである。

【0038】

【図24】複数感染症の分類の概要を示す。パネルAは、デング、西ナイルウイルス(WNV)、梅毒、B型肝炎ウイルス(HBV)、正常血、溪谷熱およびC型肝炎ウイルスのクラスター化免疫署名結合プロファイルを示すヒートマップである。パネルBは、PCA分類のグラフ表示である。

【0039】

【図25】本発明の免疫署名システムのコンポーネントの略図である。

【0040】

【図26】パネルAはファージディスプレイライブラリーを示す。パネルBはペプチドマイクロアレイを示す。

【0041】

【図27】合成したペプチドの平均長をパターンニング工程数に対して示す。X軸はパターンニングサイクル数であり、Y軸は平均ペプチド長である。任意の数のパターンニングサイク

10

20

30

40

50

ルを使用して、ここに開示するパターンングアルゴリズムは、パターンング工程をほとんど半減させる。

【0042】

【図28】標準的な層毎のアプローチと対比した新規パターンングアルゴリズムを使用してモノマーとして全20個のアミノ酸を適用して製造した結果を示す。

【0043】

【図29】平均12残基長を達成するために60回未満の工程を必要とした免疫署名態様の結果を示す。

【0044】

【図30】16種のアミノ酸を使用した70回工程の最適化アルゴリズムに由来する分布を示す。

10

【0045】

【図31】ペプチドアレイ製造後に選択したペプチドの長さの分布を示す。

【0046】

【図32】3アミノ酸長、4アミノ酸長または5アミノ酸長である可能な配列の分布を示すグラフである。

【0047】

【図33】選択ペプチドライブラリーに対するペプチドの位置の関数としてのアミノ酸組成を示す。

【発明を実施するための形態】

20

【0048】

詳細な記載

“健康”は、ほとんど全ての人間活動および相互作用の連続的に変化する結果を表す複合的状态である。このことが、健康状態を定量的に定義することを困難にする。何千もの生化学的および身体的結果を系統的に測定しなければならない。健康モニタリングの大きな課題は、種々の刺激に対する対象の応答の複雑さである。ほとんどの生物は毎日多くの異なる刺激に曝されているが、また一方で、ある生物はこのような刺激に応答し、疾患の開始または形成を防ぐことができる生物学的構造および過程のシステムを有する。適切に機能するために、このようなシステムは広範な刺激、例えばウイルスまたは寄生蠕虫の存在を検出し、これらのもの、異常細胞および/または組織に対する体内の応答を開始しなければならない。

30

【0049】

健康モニタリングにおける必然的な大挑戦は、複合的刺激に対する対象の応答の複雑さである。例えば、生体内の罹患細胞によって惹起される生理学的応答は、感染に対する生理学的応答と異なり得る。さらに、例えば、感染または癌の初期徴候を検出し、処理し、認識し、そして動作する能力は、対象の健康に大きな影響を有し得る。腫瘍細胞が増殖し、免疫系を抑制し、転移コロニーを形成し、組織を損傷させる時間を与える前に癌と診断されたら、治療に対してより好ましく応答することを期待できる。

【0050】

同様に、対象内の病原体の存在が感染直後に検出されたら、宿主炎症が感染菌の接近を阻害する前に、そして病原体負荷が免疫学的に圧倒的になる前に、抗菌剤を投与することができる。狼瘡のような自己免疫性疾患が、自己抗体レベルが低いうちに早期に検出されたら、免疫学的フレアを鎮静させるための処置ははるかに有効であろう。幸いなことに、免疫系が対象の健康状態を連続的にモニタリングしている。しかしながら、健康モニタリングおよび早期発見のための安定で、信頼でき、有効な方法に対する要請はまだ満たされていない。

40

【0051】

免疫署名は、液性免疫の複雑な応答を表示し、それを機械で読み取ることができる定量的形式に変換するマイクロアレイとファージ技術の融合である。免疫署名は、健康状態のほんのわずかな変動でさえ、早期に正確に検出する。抗体レパートリーのこれらの包括的

50

測定は、何らかの病的状態の、迅速、経済的かつ早期の診断のための手段を提供し、最終的に、免疫署名の連続的モニタリングは、危険な疾患状態を症状が出る前に検出する手段を提供し得る。

#### 【0052】

ここに開示する本発明は、それゆえに、健康モニタリング、診断、処置および予防的健康管理のための、鋭敏、安定、有効かつ信頼し得る方法を提供する。ここに開示する態様は、対象の液性状態とある状態を結びつけるための大規模プラットフォームを提供することにより、多くの種々の状態および健康状態に対する関連マーカーおよび代替マーカーの欠如に対処する。

#### 【0053】

生理学的システムの如何なる要素も、外来性であれ内在性であれ、ある状態または健康状態のポジティブまたはネガティブマーカーとして役立ち得る。免疫システムは、外来および内在因子を含む広範なマーカーを検出するように設計された、生体内の生物学的構造および過程の生理学的システムである。免疫系は多様な抗体を製造でき、これは個体の末梢血試料に存在しており、内因性に高濃度まで増量できる。抗体は大量になり得て、高標的親和性を有し、極めて多様なエピトープおよび構造的柔軟性を示し得る。

#### 【0054】

抗体などの免疫系の成分は、極めて安定であり、対象の健康状態の適切なマーカーとして作用し得る。血液、血漿および/または血清中の抗体は加熱、乾燥および/または広範なpH値に付されまたは曝露されたとき、その完全性を維持できる。血液、血漿および/または血清中の抗体は、乾燥、凍結または水分排除状態で長期保存したとき、その完全性を維持できる。抗体は、例えば、抗体を乾燥濾紙上に保存し、送付したとき、完全性を一部および/または完全に維持できる。このような特性により、ほとんどの血液、血漿および/または血清試料が、状態のモニタリング、診断、予防および処置の方法において使用するための生物学的マーカー源としての可能性を有する。

#### 【0055】

本発明は、血液試料、乾燥血液試料、血清試料、血漿試料、唾液試料、検査綿棒、生検試料、組織試料、皮膚試料、毛髪試料、脳脊髄液試料、糞便試料または尿試料のような生体試料を対象の健康状態と結びつけるためのアレイおよび方法を提供する。ある態様において、生体試料は、非天然ペプチド配列のペプチドアレイと接触させる血液試料である。ある態様において、対象は、例えば“フィンガースティック”または“フィンガーブリック”により少量の血液を採取し、それを濾紙もしくは他の吸着材などの表面に添着するかまたはバイアルもしくは容器に入れ、所望により乾燥させてよい。例えば、対象の血液1滴から得て、濾紙に載せた生体試料を、処理をせずに本発明の方法の提供業者に直接送付できる。対象から提供された生体試料を濃縮または希釈してもよい。

#### 【0056】

本発明のペプチドアレイは、少量の生体試料の、アレイ中の多数のペプチドへの結合パターンを高感度で検出するように構築できる。ある態様において、本発明は、生体試料の多数のペプチドへの結合パターンを検出し、処理し、解析し、ある状態と関連させる方法を提供する。ある態様において、本発明は、対象の健康状態と結びついた“免疫署名”を作成する。

#### 【0057】

免疫署名は、抗体応答を検出し、数学的に解析できる一群の論理的シグナルに分配する。本発明のアレイおよび方法により得た免疫署名から一群の論理的シグナルは、癌、炎症、感染および他の生理的状态を含む種々の状態の診断のための安定で、包括的な方法を提供できる。免疫署名は、種々の状態の診断のための、伝統的な、個々のタンパク質または遺伝子バイオマーカーとは異なる、これらに代わる手段である。本発明のアレイおよび方法により得た免疫署名から一群の論理的シグナルは、予防医療、健康モニタリング、診断の有効な方法としておよび処置方法として使用できる。

#### 【0058】

10

20

30

40

50

### 抗体バイオマーカーの多重化検出

他のあまり豊富でないバイオマーカーとは異なって、宿主が作製した抗体を検出するように設計した診断方法は、稀な事象を検出するために十分に感受性である可能性が高い。これらのマーカーの途方もなく多様な供給源が循環血に既に存在するため、高親和性、高特異性抗体の豊富な供給を創成する必要がない。抗体を検出するために設計した多重化アレイにおいては、タンパク質またはペプチドの複数パネルを固体支持体に結合させ、次いで血液に曝すだけである。

#### 【0059】

タンパク質アレイは、一回の検査で多数のパラメータを同時に検出できる大容量方法として台頭しつつある。タンパク質標的は、抗体結合のための立体構造エピトープ源を提供するが、直線状エピトープは必ずしも露出しない。Invitrogenは、1枚のスライドに配置された~9000種の異なるバキュロウイルス製造ヒトタンパク質を含む、より包括的なタンパク質マイクロアレイの一つを製造する。これらの大規模タンパク質アレイの可能性は、スライドあたりの高い原価、規模拡大性の欠如ならびに組み換えタンパク質生産、精製および安定性が一貫しないことにより抑制されている。インビトロで合成されたタンパク質の使用はタンパク質生産の処理量および成功を改善しているが、配置された数、安定性、翻訳後修飾および膜(表面)に対するバイアス、多量体の大タンパク質の非一貫性は未解決のままである。これらの方法は、既知変異体または病原体由来候補タンパク質を個別に特異的に合成しない限り、自己抗体の検出に限定される。罹患細胞の生化学的分画は、修飾および変異抗原に対する抗体をクエリーとすることを可能にしたが、これは大幅により複雑な方法である(Hanash, S. (2003) Disease proteomics. Nature 422, 226-232)。

#### 【0060】

タンパク質と比較して、ペプチドは、高度に再現可能であり、純粋かつ長期保存に安定な製品を大量に入手可能とするように化学合成できる。生物学的に有意な修飾または検出分子を結合させることは簡単であり、非天然分子の設計も可能である(Reddy, M.M., et al. Identification of Candidate IgG Biomarkers for Alzheimer's Disease via Combinatorial Library Screening. Cell 144, 132-142)。

#### 【0061】

ペプチドは、固体支持体に結合しているときでも変わりなく溶液中に提示され、抗体相互作用をバッチ毎の製品差にかかわらず高度に一貫性がある構造に対してスクリーニングされる。ペプチドマイクロアレイは、タンパク質マイクロアレイよりも遙かに古くから利用でき(Panicker, R.C., et al. (2004) Recent advances in peptide-based microarray technologies. Comb Chem High Throughput Screen 7, 547-556)、種々の用途に使用されてきた。酵素(Fu, J., et al. (2010) Exploring peptide space for enzyme modulators. J Am Chem Soc 132, 6419-6424; およびFu, J., et al. (2011) Peptide-modified surfaces for enzyme immobilization. PLoS One 6, e18692)、タンパク質(Diehnelt, C.W., et al. Discovery of high-affinity protein binding ligands-backwards. PLoS One 5, e10728; Greving, M.P., et al. High-throughput screening in two dimensions: binding intensity and off-rate on a peptide microarray. Anal Biochem 402, 93-95; Greving, M.P., et al. Thermodynamic additivity of sequence variations: an algorithm for creating high affinity peptides without large libraries or structural information. PLoS One 5, e15432; Gupta, N., et al. Engineering a synthetic ligand for tumor necrosis factor-alpha. Bioconjug Chem 22, 1473-1478)、DNAおよび小分子(Boltz, K.W., et al. (2009) Peptide microarrays for carbohydrate recognition. Analyst 134, 650-652; Foong, Y.M., et al. (2012) Current advances in peptide and small molecule microarray technologies. Curr Opin Chem Biol 16, 234-242; Morales Betanzos, C., et al. (2009) Bacterial glycoprofiling by using random sequence peptide microarrays. ChemBiochem 10, 877-888)、全細胞(Falsey, J.R., et al. (2001) Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. Bioconjug Chem 12, 346-353)および抗体(Cerecedo, I., et al. (200

10

20

30

40

50

8) Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *J Allergy Clin Immunol* 122, 589-594; Cretich, M., et al. (2009) Epitope mapping of human chromogranin A by peptide microarrays. *Methods Mol Biol* 570, 221-232; Lin, J., et al. (2009) Development of a novel peptide microarray for large-scale epitope mapping of food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 124, 315-322, 322 e311-313; Lorenz, P., et al. (2009) Probing the epitope signatures of IgG antibodies in human serum from patients with autoimmune disease. *Methods Mol Biol* 524, 247-258; Perez-Gordo, M., et al. (2012) Epitope mapping of Atlantic salmon major allergen by peptide microarray immunoassay. *Int. Arch Allergy Immunol* 157, 31-40; および Shreffler, W.G., et al. (2005) IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2. *J Allergy Clin Immunol* 116, 893-899)は、ペプチドへの結合についてアッセイできる生体分子のほんの一部である。古典的例はエピトープマッピングであり、抗原大の多くのペプチドをタイル張りし、モノクローナル抗体のエピトープを効果的に解読することができる。高特異性抗体はそのエピトープ配列を認識し、結合し、通常、他の抗原由来ペプチドとはほとんど結合しないか測定可能な結合はしない。この方法を用いて、同一抗原に対して誘導された種々のモノクローナルが区別され、特徴付けられる。

10

#### 【 0 0 6 2 】

##### 交差反応の妥当性

免疫系は、自己タンパク質を無視し、非自己標的と相当な強度で結合する抗体を誘発し、増幅するために進化している。これらの相反する圧は、分子レベルで明らかになる。典型的抗体は、~ 15 アミノ酸のエピトープを認識し、そのうち~ 5 アミノ酸が結合エネルギーを支配する。これらの5残基のいずれかの変化は結合強度に大きく影響する。

20

#### 【 0 0 6 3 】

他のエピトープ位置の配列変化は、結合領域の空間的配座を変え、全体的強度に中程度に影響する。それゆえに結合強度を最大化すべきであるならば、高親和性残基と低親和性残基が相互作用することを可能にするために条件を調節しなければならない。これは、ストリンジェンシーの低下を意味し、結果的に、エピトープ配列の異型が抗体と結合することを可能にする。さらに交差反応の可能性に関与して、抗体は、多くの重複パラトープを含む50アミノ酸可変領域(抗体のエピトープ認識部分)を有する(Mohan, S., et al. (2009) Association energetics of cross-reactive and specific antibodies. *Biochemistry* 48, 1390-1398; Thorpe, I.F., and Brooks, C.L., 3rd (2007) Molecular evolution of affinity and flexibility in the immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8821-8826; および Zhou, Z.H., et al. (2007) Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *J Autoimmun.* 29, 219-228. Epub 2007 Sep 2020)。

30

#### 【 0 0 6 4 】

これらのパラトープの各々は、パラトープおよびエピトープが、相補性領域の形状および電荷を規定するサイズが類似したストレッチであるように~ 15 アミノ酸からなる。パラトープは1個を超えるエピトープと結合でき、単一エピトープは1個を超えるパラトープと結合でき、各対は独特の結合特性を示す。単一抗体が複数パラトープを有するため、抗体は、多様な強度で結合できる、明確な、同時に潜在的に多様なエピトープのセットを有する。この交差反応ならびに特異性および親和性の複合的關係は、差し迫った脅威に対する直接的攻撃および将来的な変異形への暴露の可能性に対する間接的攻撃を編成する精緻な免疫系の特質である。

40

#### 【 0 0 6 5 】

インビトロで、特定の直線状エピトープに特異的な抗体は、配列関連ペプチドだけでなく、無関係のものにも結合することが示されている(Folgori, A., et al. (1994) A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random pe

50

ptide libraries and human sera. *Embo J* 13, 2236-2243)。これらの、典型的に立体構造関連性を示すが、配列が関連しないペプチドはミモトープとして知られ、初期ファージディスプレイ研究で最初に報告された(Folgori, A., et al. (1994) A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *Embo J* 13, 2236-2243; Christian, R.B., et al. (1992) Simplified methods for construction, assessment and rapid screening of peptide libraries in bacteriophage. *Journal of Molecular Biology* 227, 711-718; Liu, R., et al. (2003) Combinatorial peptide library methods for immunobiology research. *Experimental Hematology* 31, 11-30; Wang, Y., et al. (1995) Detection of Mammary Tumor Virus ENV Gene-like Sequences in Human Breast Cancer. *Cancer Research* 55, 5173-5179)。

#### 【 0 0 6 6 】

ファージベースのシステムは、他のほとんどのシステムで可能であるよりはるかに大きなリガンド多様性のライブラリーを構築し、スクリーニングする機会を提供する。例えば、ペプチドを提示する大無作為配列ライブラリーを、特定のモノクローナル抗体に対してパニングした。選択工程の反復により、しばしば、同族エピトープだけでなく、数種の無関係ペプチド配列の同定に至る。無作為ペプチド多様性が、生物学的配列多様性を何桁も上回るとの事実は、このペプチドが何らかの生物学的ペプチドと対応していないことを意味する。全ての結合反応は、抗体固有の特性である非同族、交差反応性に依存する。これは、何らかのカテゴリの抗体に対するリガンドが同定できることを意味する。自己抗原、修飾抗原、変異エピトープまたは非ペプチド性ミモトープ。無作為配列空間でスクリーニングするこれらの利点にもかかわらず、ファージディスプレイ技術は、ファージでのパニングと細菌培養工程の反復、バイナリ選択過程および拡張性の欠如により制限される(Derda, R., et al. (2011) Diversity of phage-displayed libraries of peptides during panning and amplification. *Molecules* 16, 1776-1803; Szardenings, M. (2003) Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *J Recept Signal Transduct Res* 23, 307-34953, 54)。今日まで、無作為ファージライブラリーは抗体バイオマーカーを作製していない。

#### 【 0 0 6 7 】

##### 免疫署名

免疫署名は、上記テクノロジーの統合である。第一に、ペプチドを生物学的にファージに提示させるのではなく、合成した、長いペプチドをスライド・ガラス上にアドレス可能な規則的配列で結合させるのは、はるかにシステムティックな方法である。ファージライブラリーの個々のクローンは  $10^{10}$  個を超え得るが、マイクロアレイは、スライドあたり数千から数百万のスポットに増やされている。原価、信頼性、精度およびアッセイ速度は、マイクロアレイに大きな優位性を付与する。マイクロアレイは、それ自体その低原価および拡張性により、ゲノミクスおよびプロテオミクスに非常に有効であることが証明されており、アレイチャンバーおよびスキャナーが多年にわたって販売されている。

#### 【 0 0 6 8 】

第二に、抗体を疾患としてバイオマーカーを使用することは、安定で容易に入手できる分子および免疫系の多様性、モニタリングおよび生物学的増幅という好都合な特性を利用する。哺乳動物免疫系の複雑さは驚異的であり(Janeway, C., and Travers, J. (1997) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Current Biology Limited)、それゆえに情報量もそうである。免疫学者がイムノームを調べるに連れて、 $> 10^{10}$  の異なる分子種が可能な抗体レパートリー(Nobrega, A., et al. (1998) Functional diversity and clonal frequencies of reactivity in the available antibody repertoire. *European Journal of Immunology* 28, 1204-1215)が、個々の健康状態の過去、現在そしてさらに前駆的動揺のダイナミック・データベースであるとの合意が広まりつつある。

#### 【 0 0 6 9 】

第三に、無作為配列ペプチドの使用は、抗体レパートリーの多様性がスクリーニングす

ベキリガンドの不偏の包括的ライブラリーにより対合されることを可能にする。無作為配列ペプチドはファージディスプレイライブラリーで使用できるが、それらはバイアスを有し、雑然とした、制御不十分な形式ではない。無作為ペプチド配列が制約がなく、生物学的空間に意図的の同位性を有しないため、マイクロアレイは希薄な、しかし極めて広範な配列空間の被覆率を有する。何らかの疾患または生物に対応する正常な、変異した、翻訳後修飾されたおよび模倣のエピトープは同一マイクロアレイ上でスクリーニングできる。この分野の最近の文献は、 $10^7$ 個の独特の無作為配列 $20$ 量体ペプチドを使用して、多数の疾患状態を特徴付けしている<sup>1, 10</sup> (Brown, J.R., et al. (2011) *Statistical methods for analyzing immunosignatures*. *BMC Bioinformatics* 12, 349; Hughes, A. K., et al. (2012) *Immunosignaturing can detect products from molecular markers in brain cancer*. *PLoS One* 7, e40201; Kroening, K., et al. (2012) *Autoreactive antibodies raised by self derived de novo peptides can identify unrelated antigens on protein microarrays. Are autoantibodies really autoantibodies?* *Exp Mol Pathol* 92, 304-311; Kukreja, M., et al. (2012) *Comparative study of classification algorithms for immunosignaturing data*. *BMC Bioinformatics* 13, 139; Kukreja, M., et al. (2012) *Immunosignaturing Microarrays Distinguish Antibody Profiles of Related Pancreatic Diseases*. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*; および Legutki, J.B., et al. (2010) *A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection*. *Vaccine* 28, 4529-4537)。

10

20

#### 【0070】

ファージディスプレイと免疫署名マイクロアレイで得られた結果に幾つかの顕著な差がある。免疫署名はアレイ上のペプチド全てをクエリーとし、各々について結合値を生じる。ファージディスプレイは、限定的選択で生き残った配列を捉え、典型的にコンセンサス配列しか同定しない。免疫署名マイクロアレイの処理は、数週間ではなく数時間で済む。図14は、これらのテクノロジーの差異を示す。技術的に、'免疫署名'は、各々疾患のある状態と他のものを確実に差別できる特定の結合値を有する、統計学的に有意なペプチドのパターンをいう。

#### 【0071】

テクノロジーのこの統合は、普遍的に適用できる早期診断プラットフォームの目標に向けた進歩となり得る。未解決である重要な課題は、i) 該免疫系が感染性および慢性疾患のどちらにも一貫した疾患特異的液性応答を誘発するか否か、ii) 抗体が、臨床的に有用であるように疾患の病因に十分に早期に応答するか否かおよびiii) 本アッセイが確実な決定のために多数の患者試料をスクリーニングするのに十分に感受性で、情報価値があり、低原価で拡張性があるか否かである。これらの点を充足できたならば、何らかの免疫が関係する疾患の免疫署名を発見できる。反応性のこれらの規定パターンを、その後、早期のおよび網羅的な疾患診断に使用できる。これらの試験が市民に広く利用可能とすることができれば、免疫署名は、個人だけでなく、疫学的レベルでも重要な意味のある長期健康モニタリングシステムの基礎となる。我々は、この点に関して有望なこのプラットフォームの幾つかの特性を示す。

30

#### 【0072】

免疫署名は、上記テクノロジーの統合である。第一に、ペプチドを生物学的にファージに提示させるのではなく、合成した、長いペプチドをスライド・ガラス上にアドレス可能な規則的配列で結合させるのは、はるかにシステムティックな方法である。ファージライブラリーの個々のクローンは $10^{10}$ 個を超え得るが、マイクロアレイは、スライドあたり数千から数百万のスポットに増やされている。原価、信頼性、精度およびアッセイ速度は、マイクロアレイに大きな優位性を付与する。マイクロアレイは、それ自体その低原価および拡張性により、ゲノミクスおよびプロテオミクスに非常に有効であることが証明されており、アレイチャンパーおよびスキャナーが多年にわたって販売されている。第二に、抗体を疾患としてバイオマーカーを使用することは、安定で容易に入手できる分子および免疫系の多様性、モニタリングおよび生物学的増幅という好都合な特性を利用する。

40

50

## 【0073】

哺乳動物免疫系の複雑さは驚異的であり、それゆえに情報量もそうである。免疫学者がイムノームを調べるに連れて、 $> 10^{10}$ の異なる分子種が可能な抗体レパートリーが、個々の健康状態の過去、現在そしてさらに前駆的動揺のダイナミック・データベースであるとの合意が増えている。第三に、無作為配列ペプチドの使用は、抗体レパートリーの多様性がスクリーニングすべきリガンドの不偏の包括的ライブラリーにより対合させることを可能にする。無作為配列ペプチドはファージディスプレイライブラリーで使用できるが、それらはバイアスを有し、雑然とした、制御不十分な形式ではない。無作為ペプチド配列が制約がなく、生物学的空間に意図的の相同性を有しないため、マイクロアレイは希薄な、しかし極めて広範な配列空間の被覆率を有する。

10

## 【0074】

何らかの疾患または生物に対応する正常な、変異した、翻訳後修飾されたおよび模倣されたエピトープは同一マイクロアレイ上でスクリーニングできる。この分野の文献は、10,000個の独特の無作為配列20量体ペプチドを使用して、多数の疾患状態を特徴付けしている。ファージディスプレイと免疫署名マイクロアレイで得られた結果に幾つかの顕著な差がある。免疫署名はアレイ上のペプチド全てを問題とし、各々について結合値を生じる。ファージディスプレイは、制限的選択で生き残った配列を与え、典型的にコンセンサス配列しか同定しない。

## 【0075】

免疫署名マイクロアレイの処理には、数週間ではなく数時間で済む。‘免疫署名’は、各々疾患のある状態と他とものを確実に分類できる特定の結合値を有する、統計学的に有意なペプチドのパターンをいう。したがって、ここに開示する態様の一つの面は、複合的生体試料で免疫署名アレイのクエリー実行のための比較的速い処理時間であり、ここで、クエリー実行および処理時間は最長10分、最長20分、最長30分、最長45分、最長60分、最長90分、最長2時間、最長3時間、最長4時間または最長5時間かかり得る。あるいは、クエリー実行および処理時間は、長くて10分、長くて20分、長くて30分、長くて45分、長くて60分、長くて90分、長くて2時間、長くて3時間、長くて4時間または長くて5時間かかり得る。

20

## 【0076】

テクノロジーのこの統合は、普遍的に適用できる早期診断プラットフォームの目標に向けた進歩となり得る。未解決である重要な課題は、i) 該免疫系が感染性および慢性疾患のどちらにも一貫した疾患特異的液性応答を誘発するか否か、ii) 抗体が、臨床的に有用であるように疾患の病因に十分に早期に応答するか否か、およびiii) 本アッセイが確実な決定のために多数の患者試料をスクリーニングするのに十分に感受性で、情報価値があり、安価で拡張性があるか否かである。これらの点を充足できたならば、何らかの免疫が関係する疾患の免疫署名を発見できる。

30

## 【0077】

反応性のこれらの規定パターンを、その後、早期的および網羅的な疾患診断に使用できる。これらの試験が市民に広く利用可能とすることができれば、免疫署名は、個人だけでなく、疫学的レベルでも重要な意味のある長期健康モニタリングシステムの基礎となる。我々は、この点に関して有望なこのプラットフォームの幾つかの特性を示す。

40

## 【0078】

免疫署名の独特の特性

抗体パラトープのリガンドに対する親和性に加えて、結合強度は、血清中の抗体種の濃度に左右される。ファージディスプレイと異なり、免疫署名は、これらのパラメータの結果を定量的に測定でき、極めて大きなダイナミック・レンジで定量的測定できる (Legutki, J.B., et al. (2010) A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection. *Vaccine* 28, 4529-4537; Stafford, P., and Johnston, S. (2011) Microarray technology displays the complexities of the humoral immune response. *Expert Rev Mol Diagn* 11, 5-8; Halperin, R.F., et al. (2011) *Expl*

50

oring Antibody Recognition of Sequence Space through Random-Sequence Peptide Microarrays. *Molecular & Cellular Proteomics* 10)。

【 0 0 7 9 】

科学者は、この能力を使用して、高親和性モノクローナル抗体の免疫署名マイクロアレイへの結合を試験した。その結果、単一モノクローナルが数百個の無作為配列を認識し、これらの独特の結合反応の様々な強度を測定し、比較できることが発見された(Halperin, R.F., et al. (2011) Exploring Antibody Recognition of Sequence Space through Random-Sequence Peptide Microarrays. *Molecular & Cellular Proteomics* 10)。奇妙なことに、これらのオフターゲットミモトープ相互作用の多くは、同族エピトープより高い結合であった。これらの相互作用の対応する液相結合は低い、免疫署名マイクロアレイを構築する方法がこれらの相互作用を増強する。免疫署名マイクロアレイへのオフターゲット抗体結合のこの免疫学的現象が、このテクノロジーの中核である。

10

【 0 0 8 0 】

他の重要な発見は、低親和性相互作用の検出について、免疫署名がファージディスプレイまたはELISAベースのアッセイよりも感受性が高いことである(Stafford, P., and Johnston, S. (2011) Microarray technology displays the complexities of the humoral immune response. *Expert Rev Mol Diagn* 11)。この高感度は、スライド表面上のペプチドが高密度である結果であり、“免疫署名効果”と呼ばれている。これは、機能化ガラス表面上の種々の空間的配置のペプチドのプリントおよび試験により確立されている。アレイが、ペプチドが約9 ~ 約12 nm離れるようにプリントされたら、同族エピトープは、オフターゲット無作為ペプチドよりも有利に抗体と競合する(ただし、非常に強力なミモトープを除く)。

20

【 0 0 8 1 】

本発明者らは、通常ペプチドを平均1 ~ 2 nm離すが、3 ~ 4 nm離れたペプチドとのオフターゲット結合が見られる。ペプチドを約1 ~ 約1.5 nm離れたならば、オフターゲット結合の増加が見られる。密集したペプチドは、アビディティおよび急速再結合を介して抗体を捕捉するようである。この概念は、極めて再現性があることが示されており、図26に記載する(Stafford, P., et al. (2012) Physical characterization of the “immunosignaturing effect”. *Mol Cell Proteomics* 11, M111 011593; Chase, B.A., et al. (2012) Evaluation of biological sample preparation for immunosignature-based diagnostics. *Clin Vaccine Immunol* 19, 352-358; Hughes, A.K., et al. (2012) Immunosignaturing can detect products from molecular markers in brain cancer. *PLoS One* 7, e40201; Restrepo, L., et al. (2011) Application of immunosignatures to the assessment of Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 70, 286-295)。ペプチドの配列は完全に無作為であるが、抗体のオフターゲット捕獲は明らかに無作為ではなく、むしろ、アレイへの血清結合パターンは著しく整合性がある。このテクノロジーに対する初期の懸念は、ある血清試料中の抗体種の大きな多様性が重複結合の競合を生じ、平らで情報価値のない場の強度に終わるはずであるとのことであった。データはこれを実証していない。実際、血清で希釈した精製モノクローナル抗体でさえ、結合をほとんど失うことなく、または全く失うことなく、その特徴的反応性パターンを維持する(Uhlen, M., and Hober, S. (2009) Generation and validation of affinity reagents on a proteome-wide level. *J Mol Recognit* 22, 57-64)。

30

40

【 0 0 8 2 】

従来の核酸マイクロアレイの説明に使用された古典的統計学的モデル(Draghici, S. (2012) *Statistics and Data Analysis for Microarrays Using R and Bioconductor*. Chapman & Hall/CRC)は、免疫署名アレイにより提示された新しい複雑さに対処するための柔軟性を有していない。マイクロアレイ上の相補的プローブへのRNAまたはDNA結合を説明する一対一結合モデルよりむしろ、免疫署名ペプチドは1個を超える抗体に結合でき、多様な抗体が同一ペプチドに結合できる。3編の文献が、特に免疫署名について画像解析方法(Yang, Y., et al. (2011) Segmentation and intensity estimation for microar

50

ray images with saturated pixels. BMC Bioinformatics 12, 462)、因子解析および混合モデル(Brown, J.R., et al. (2011) Statistical methods for analyzing immunosignatures. BMC Bioinformatics 12, 349)および分類(Kukreja, M., et al. (2012) Comparative study of classification algorithms for immunosignaturing data. BMC Bioinformatics 13, 139)を比較している。疾患の識別を可能とする多くの基本的特性が免疫署名マイクロアレイにある。

#### 【 0 0 8 3 】

第一に、健常ボランティアからの対照血清は、ベースライン結合反応性のかなり広い分布を示す。これにより、本テクノロジーを使用した大規模研究では、集団変動性を調整するために多数の非罹患個体からの血清を集める必要性が課せられる。第二に、ある疾患患者の血清の署名は、非疾患血清と異なり、極めて一致する。この観察は、免疫系が常に局所環境を探查し、反応し、署名の大きな差の原因となることを意味する。しかしながら、ある抗原に指向させたら、抗体は、個体変動性がほとんどない、狭く、かつ明確に定義された署名を形成する傾向にある。

10

#### 【 0 0 8 4 】

たとえそうであっても、本テクノロジーは、疾患のサブタイプを識別でき(Hughes, A.K., et al. (2012) Immunosignaturing can detect products from molecular markers in brain cancer. PLoS One 7, e40201)、同時に対照対罹患者をなお区別する。複数のペプチド間の一般的関連および共分散の解析は、単一エピトープレベルでは不可能である素晴らしい識別力を提供する。免疫学的に、抗体：ペプチド結合パターンは、非特異的危険信号または天然抗体の活動を生じず、これらは認識できる刺激により製造される。抗体吸着実験は、インフルエンザ感染者からのペプチドが大部分はウイルス特異的抗体に結合し、アルツハイマー病の署名は多くの抗 A 抗体に結合することを示す(Legutki, J.B., et al. (2010) A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection. Vaccine 28, 4529-4537; Restrepo, L., et al. (2011) Application of immunosignatures to the assessment of Alzheimer's disease. Annals of Neurology 70, 286-295)。

20

#### 【 0 0 8 5 】

免疫署名による疾患判定は、現在の臨床検査によって得られた結果とよく相関している(Hughes, A.K., et al. (2012) Immunosignaturing can detect products from molecular markers in brain cancer. PLoS One 7, e40201; Kukreja, M., et al. (2012) Immunosignaturing Microarrays Distinguish Antibody Profiles of Related Pancreatic Diseases. Journal of Proteomics and Bioinformatics; Legutki, J.B., et al. (2010) A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection. Vaccine 28, 4529-4537)。免疫署名は、伝統的診断では利用できない健康歴情報を有し、すなわち、即時および記憶応答の両者を検出できる(Legutki, J.B., et al. (2010) A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection. Vaccine 28, 4529-4537)。今日まで、このアプローチは、マウス、ラット、イヌ、ブタおよびヒト宿主のウイルス、細菌、真菌および寄生虫感染症、癌、糖尿病、自己免疫性疾患、移植片患者および多くの慢性疾患を含む33種を超える疾患および続発症に適用されている。ペプチド結合パターンの高度に再現可能なパターンが確立でき、病理と関連する。

30

40

#### 【 0 0 8 6 】

これらの結合プロファイルは、患者および健常ボランティアから得た盲検の血清試料を正確に分類し、感受性および精度の点で古典的免疫試験より優れている。大規模研究において、免疫署名は、渓谷熱患者を極めて高精度に診断でき、最初は標準的 E L I S A 試験で陰性であった患者の正確な診断もあった。患者免疫署名の解析は、癌間および癌内の区別もでき(Brown, J.R., et al. (2011) Statistical methods for analyzing immunosignatures. BMC Bioinformatics 12, 349; Hughes, A.K., et al. (2012) Immunosignaturing can detect products from molecular markers in brain cancer. PLoS One 7, e40201

50

; Kukreja, M., et al. (2012) Immunosignaturing Microarrays Distinguish Antibody Profiles of Related Pancreatic Diseases. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*; およびYang, Y., et al. (2011) Segmentation and intensity estimation for micro array images with saturated pixels. *BMC Bioinformatics* 12, 462)、薬剤処置に应答するまたはしない癌タイプの正確な診断に至るほどであった(Hughes, A.K., et al. Immunosignaturing can detect products from molecular markers in brain cancer. *PLoS One* 7, e40201)。

#### 【 0 0 8 7 】

免疫署名テクノロジーの最も独特な特徴の一つは、特に、かつては測定不可能とされた相互作用群である、低下したペプチド - 抗体反応の測定であることが判る。すなわち、罹患個体からの血清が正常血清に比して高いシグナルを生じている一方で、健常者に比して一貫して低い結合を示すペプチドもある(Kukreja, M., et al. (2012) Immunosignaturing Microarrays Distinguish Antibody Profiles of Related Pancreatic Diseases. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*; およびLegutki, J.B., et al. (2010), A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection. *Vaccine* 28, 4529-4537)。免疫応答におけるこれらの“低い”ペプチドの役割は興味深い。その最も単純なレベルで、これらの“低い”ペプチドは疾患分類の質を高めるが、他では判らない何らかの基礎的免疫現象がある可能性がある。

10

#### 【 0 0 8 8 】

##### アレイへの分子の結合

国立癌研究所によると、約150種の癌があり、どのように定義するかによって、数百の異なるサブタイプがある。抗体は、しばしば腫瘍細胞が発現した抗原に対して惹起され、その後B細胞成熟の間に増幅される。抗体はまたワクチンまたは感染に対して应答する間にも惹起される。抗体はまた対象が毎日種々の病原性、ならびに非病原性刺激に曝されている間にも惹起され得る。

20

#### 【 0 0 8 9 】

対象の体内での抗体増幅過程は、状態に付随する対象特異的マーカーの十分な供給源となり得る。抗体増幅は、対象および/または状態の特定の健康状態に付随する豊富な数の抗体を提供できる。試料中に十分な数の抗体が存在することは、健康モニタリング方法における人工的バイオマーカー増幅の必要性を減らし得る。試料中に十分な数の抗体が存在することは、例えば、健康モニタリング方法において、少量の試料の適用での成功を可能にする。

30

#### 【 0 0 9 0 】

本発明の方法およびアレイは、対象からの少量の生体試料での健康モニタリング、診断、処置および予防を可能にする。ある態様において、生体試料は、さらに処理することなく、少量で本発明の方法に使用できる。ある態様において、生体試料は、血液、血清、唾液、汗、細胞、組織または何らかの体液を含む。ある態様において、約0.5nl、約1nl、約2nl、約3nl、約4nl、約5nl、約6nl、約7nl、約8nl、約9nl、約10nl、約11nl、約12nl、約13nl、約14nl、約15nl、約16nl、約17nl、約18nl、約19nl、約20nl、約21nl、約22nl、約23nl、約24nl、約25nl、約26nl、約27nl、約28nl、約29nl、約30nl、約31nl、約32nl、約33nl、約34nl、約35nl、約36nl、約37nl、約38nl、約39nl、約40nl、約41nl、約42nl、約43nl、約44nl、約45nl、約46nl、約47nl、約48nl、約49nlまたは約50nl、約51nl、約52nl、約53nl、約54nl、約55nl、約56nl、約57nl、約58nl、約59nl、約60nl、約61nl、約62nl、約63nl、約64nl、約65nl、約66nl、約67nl、約68nl、約69nl、約70nl、約71nl、約72nl、約73nl、約74nl、約75nl、約76nl、約77nl、約78nl、約79nl、約80nl、約81nl、約82nl、約83nl、約84nl、約85nl、約86nl、約87nl、約88nl、約89nl、約90nl、約91nl、約92nl、約93nl、約94nl、約95nl、約96nl、約97nl、約98nl、約99nl、約0.1、約0.2  $\mu$ l、約0.3  $\mu$ l、約0.4  $\mu$ l、約0.5  $\mu$ l、約0.6  $\mu$ l。

40

50

約0.7 $\mu$ l、約0.8 $\mu$ l、約0.9 $\mu$ l、約1 $\mu$ l、約2 $\mu$ l、約3 $\mu$ l、約4 $\mu$ l、約5 $\mu$ l、約6 $\mu$ l、約7 $\mu$ l、約8 $\mu$ l、約9 $\mu$ l、約10 $\mu$ l、約11 $\mu$ l、約12 $\mu$ l、約13 $\mu$ l、約14 $\mu$ l、約15 $\mu$ l、約16 $\mu$ l、約17 $\mu$ l、約18 $\mu$ l、約19 $\mu$ l、約20 $\mu$ l、約21 $\mu$ l、約22 $\mu$ l、約23 $\mu$ l、約24 $\mu$ l、約25 $\mu$ l、約26 $\mu$ l、約27 $\mu$ l、約28 $\mu$ l、約29 $\mu$ l、約30 $\mu$ l、約31 $\mu$ l、約32 $\mu$ l、約33 $\mu$ l、約34 $\mu$ l、約35 $\mu$ l、約36 $\mu$ l、約37 $\mu$ l、約38 $\mu$ l、約39 $\mu$ l、約40 $\mu$ l、約41 $\mu$ l、約42 $\mu$ l、約43 $\mu$ l、約44 $\mu$ l、約45 $\mu$ l、約46 $\mu$ l、約47 $\mu$ l、約48 $\mu$ l、約49 $\mu$ lまたは約50 $\mu$ lの生体試料が、本発明のアレイおよび方法による解析に必要である。

#### 【0091】

対象からの生体試料を、例えば、対象から採取して、本発明のアレイと直接接触させてよい。ある態様において、生体試料は本発明のアレイとの接触前に調製または処理手順を必要としない。ある態様において、対象からの乾燥血液試料を、本発明のアレイとの接触前に希釈手順で再構成する。希釈により、対象の生体試料からの抗体を、免疫署名のための最適濃度にできる。

#### 【0092】

本発明の方法およびアレイは、対象からの少量の生体試料で健康モニタリング、診断、処置および予防を可能にする。ある態様において、本発明の方法はわずか約0.5nl~約50nl、わずか約1nl~約100nl、わずか約1nl~約150nl、わずか約1nl~約200nl、わずか約1nl~約250nl、わずか約1nl~約300nl、わずか約1nl~約350nl、わずか約1nl~約400nl、わずか約1~約450nl、わずか約5nl~約500nl、わずか約5nl~約550nl、わずか約5nl~約600nl、わずか約5nl~約650nl、わずか約5nl~約700nl、わずか約5nl~約750nl、わずか約5nl~約800nl、わずか約5nl~約850nl、わずか約5nl~約900nl、わずか約5nl~約950nl、わずか約5nl~約1 $\mu$ l、わずか約0.5 $\mu$ l~約1 $\mu$ l、わずか約0.5 $\mu$ l~約5 $\mu$ l、わずか約1 $\mu$ l~約10 $\mu$ l、わずか約1 $\mu$ l~約20 $\mu$ l、わずか約1 $\mu$ l~約30 $\mu$ l、わずか約1 $\mu$ l~約40 $\mu$ lまたはわずか約1 $\mu$ l~約50 $\mu$ lしか必要としない。

#### 【0093】

ある態様において、本発明の方法は、少なくとも0.5nl~約50nl、少なくとも約1nl~約100nl、少なくとも約1nl~約150nl、少なくとも約1nl~約200nl、少なくとも約1nl~約250nl、少なくとも約1nl~約300nl、少なくとも約1nl~約350nl、少なくとも約1nl~約400nl、少なくとも約1~約450nl、少なくとも約5nl~約500nl、少なくとも約5nl~約550nl、少なくとも約5nl~約600nl、少なくとも約5nl~約650nl、少なくとも約5nl~約700nl、少なくとも約5nl~約750nl、少なくとも約5nl~約800nl、少なくとも約5nl~約850nl、少なくとも約5nl~約900nl、少なくとも約5nl~約950nl、少なくとも約5nl~約1 $\mu$ l、少なくとも約0.5 $\mu$ l~約1 $\mu$ l、少なくとも約0.5 $\mu$ l~約5 $\mu$ l、少なくとも約1 $\mu$ l~約10 $\mu$ l、少なくとも約1 $\mu$ l~約20 $\mu$ l、少なくとも約1 $\mu$ l~約30 $\mu$ l、少なくとも約1 $\mu$ l~約40 $\mu$ l、少なくとも約1 $\mu$ l~約50 $\mu$ lまたは少なくとも50 $\mu$ lを必要とする。

#### 【0094】

対象は、例えば、生検サンプルまたは組織からの固形生体試料を含む複数の生体試料を提供できる。ある態様において、約1mg、約5mg、約10mg、約15mg、約20mg、約25mg、約30mg、約35mg、約40mg、約45mg、約50mg、約55mg、約60mg、約65mg、約7mg、約75mg、約80mg、約85mg、約90mg、約95mgまたは約100mgの生体試料が本発明のアレイおよび方法で必要である。

#### 【0095】

ある態様において、わずか約1mg~約5mg、わずか約1mg~約10mg、わずか約1mg~約20mg、わずか約1mg~約30mg、わずか約1mg~約40mg、わずか約1mg~約50mg、わずか約50mg~約60mg、わずか約50mg~約70mg、わずか約50mg~約80mg、わずか約50mg~約90mg、わずか約50mg~約100mgの生体試料しか本発明の方法お

よびアレイで必要ではない。

【0096】

ある態様において、少なくとも約1mg～約5mg、少なくとも約1mg～約10mg、少なくとも約1mg～約20mg、少なくとも約1mg～約30mg、少なくとも約1mg～約40mg、少なくとも約1mg～約50mg、少なくとも約50mg～約60mg、少なくとも約50mg～約70mg、少なくとも約50mg～約80mg、少なくとも約50mg～約90mg、少なくとも約50mg～約100mgの生体試料が本発明の方法およびアレイで必要である。

【0097】

本発明の方法およびアレイは、対象からの少量の生体試料で健康モニタリング、状態の診断、処置および予防のための高感度な方法を提供する。ある態様において、対象からの生体試料は濃縮されすぎており、本発明のアレイとの接触前に希釈が必要である。生体試料を複数回希釈後に、該試料と本発明のアレイを接触させてよい。希釈は、対数形式で濃度の等比数列をもたらすことができる連続希釈でよい。例えば、10倍連続希釈は1M、0.01M、0.001Mおよびその等比数列であり得る。希釈は、例えば、1倍希釈、2倍希釈、3倍希釈、4倍希釈、5倍希釈、6倍希釈、7倍希釈、8倍希釈、9倍希釈、10倍希釈、16倍希釈、25倍希釈、32倍希釈、64倍希釈および/または125倍希釈であってよい。

10

【0098】

生体試料は対象の身体の複数の起源に由来してよく、生体試料を対象から複数の異なる環境で採取してよい。生体試料は、例えば、毎年の身体検査での採血のような日常的医療相談中に採取できる。生体試料は、非日常的相談の過程で採取でき、例えば、生体試料を、生検の経過中に採取できる。対象はまた生体試料を自分で採取し、対象は直販形式で本発明の方法およびシステムにより処理した生体試料を提供できる。ある態様において、生体試料を本発明の方法およびアレイの提供業者に送付できる。ある態様において、濾紙上の対象からの乾燥血液試料のような乾燥生体試料を、本発明の方法およびアレイの提供業者に送付できる。

20

【0099】

ある分子の本発明のアレイへの結合は、条件と関係させ得る結合パターンを形成する。ある分子がアレイ中のあるペプチドへ結合する親和性は、数学的に条件と関係させ得る。ある抗体が複数の異なる本発明のペプチドへオフターゲット結合するパターンは、数学的に条件と関係させ得る。ある分子が複数の異なる本発明のペプチドへの結合するアビディティーは、数学的に条件と関係させ得る。オフターゲット結合およびアビディティーは、生体試料中のある分子と、ペプチドアレイ中の多数の、非同一ペプチドとの相互作用を含み得る。ある分子と、あるペプチドアレイ中の多数の、非同一ペプチドの結合アビディティーは、該分子の該ペプチドアレイに対する結合定数を決定し得る。ある態様において、試料中の抗体濃度は、例えば、該アレイ中で臨界数の抗体を捕捉し、抗体をアレイへ急速再結合をさせることにより、該ペプチドアレイへの結合アビディティーに寄与する。

30

【0100】

複数生物学的分子のアレイへの結合アビディティーは、複数結合相互作用の組み合わせにより決定できる。抗体のペプチドアレイ中の複数ペプチドへの交差反応は、結合アビディティーに寄与し得る。ある態様において、抗体は、約3アミノ酸、約4アミノ酸、約5アミノ酸、約6アミノ酸、約7アミノ酸、約8アミノ酸、約9アミノ酸、約10アミノ酸、約11アミノ酸、約12アミノ酸、約13アミノ酸、約14アミノ酸、約15アミノ酸、約16アミノ酸または約17アミノ酸のエピトープを認識できる。ある態様において、約5アミノ酸の配列は、抗体のペプチドへの結合エネルギーを支配する。

40

【0101】

分子の本発明のアレイへのオフターゲット結合および/またはアビディティーは、例えば、フェムトモル濃度(fM)からマイクロモル濃度( $\mu$ M)解離定数の範囲の結合親和性を、ダイナミック・レンジの3対数のみを使用して定量的に測定できる範囲に効果的に圧縮し得る。分子は、アレイ中の多数のペプチドに $10^3 M^{-1}$ 以上の結合定数で結合できる。

50

分子は、アレイ中の多数のペプチドに、 $10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、 $2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ の範囲の結合定数および/または $10^4 \text{ M}^{-1} \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ の範囲の結合定数で結合できる。分子は、アレイ中の多数のペプチドに、約1 fM、約2 fM、約3 fM、約4 fM、約5 fM、約6 fM、約7 fM、約8 fM、約9 fM、約10 fM、約20 fM、約30 fM、約40 fM、約50 fM、約60 fM、約70 fM、約80 fM、約90 fM、約100 fM、約200 fM、約300 fM、約400 fM、約500 fM、約600 fM、約700 fM、約800 fM、約900 fM、約1ピコモル濃度(pM)、約2 pM、約3 pM、約4 pM、約5 pM、約6 pM、約7 pM、約8 pM、約9 pM、約10 pM、約20 pM、約30 pM、約40 pM、約50 pM、約60 pM、約70 pM、約80 pM、約90 pM、約100 pM、約200 pM、約300 pM、約400 pM、約500 pM、約600 pM、約700 pM、約800 pM、約900 pM、約1ナノモル濃度(nM)、約2 nM、約3 nM、約4 nM、約5 nM、約6 nM、約7 nM、約8 nM、約9 nM、約10 nM、約20 nM、約30 nM、約40 nM、約50 nM、約60 nM、約70 nM、約80 nM、約90 nM、約100 nM、約200 nM、約300 nM、約400 nM、約500 nM、約600 nM、約700 nM、約800 nM、約900 nM、約1  $\mu\text{M}$ 、約2  $\mu\text{M}$ 、約3  $\mu\text{M}$ 、約4  $\mu\text{M}$ 、約5  $\mu\text{M}$ 、約6  $\mu\text{M}$ 、約7  $\mu\text{M}$ 、約8  $\mu\text{M}$ 、約9  $\mu\text{M}$ 、約10  $\mu\text{M}$ 、約20  $\mu\text{M}$ 、約30  $\mu\text{M}$ 、約40  $\mu\text{M}$ 、約50  $\mu\text{M}$ 、約60  $\mu\text{M}$ 、約70  $\mu\text{M}$ 、約80  $\mu\text{M}$ 、約90  $\mu\text{M}$ または約100  $\mu\text{M}$ の解離定数で結合できる。

10

### 【0102】

分子は、アレイ中の多数のペプチドに、少なくとも1 fM、少なくとも2 fM、少なくとも3 fM、少なくとも4 fM、少なくとも5 fM、少なくとも6 fM、少なくとも7 fM、少なくとも8 fM、少なくとも9 fM、少なくとも10 fM、少なくとも20 fM、少なくとも30 fM、少なくとも40 fM、少なくとも50 fM、少なくとも60 fM、少なくとも70 fM、少なくとも80 fM、少なくとも90 fM、少なくとも100 fM、少なくとも200 fM、少なくとも300 fM、少なくとも400 fM、少なくとも500 fM、少なくとも600 fM、少なくとも700 fM、少なくとも800 fM、少なくとも900 fM、少なくとも1ピコモル濃度(pM)、少なくとも2 pM、少なくとも3 pM、少なくとも4 pM、少なくとも5 pM、少なくとも6 pM、少なくとも7 pM、少なくとも8 pM、少なくとも9 pM、少なくとも10 pM、少なくとも20 pM、少なくとも30 pM、少なくとも40 pM、少なくとも50 pM、少なくとも60 pM、少なくとも70 pM、少なくとも80 pM、少なくとも90 pM、少なくとも100 pM、少なくとも200 pM、少なくとも300 pM、少なくとも400 pM、少なくとも500 pM、少なくとも600 pM、少なくとも700 pM、少なくとも800 pM、少なくとも900 pM、少なくとも1ナノモル濃度(nM)、少なくとも2 nM、少なくとも3 nM、少なくとも4 nM、少なくとも5 nM、少なくとも6 nM、少なくとも7 nM、少なくとも8 nM、少なくとも9 nM、少なくとも10 nM、少なくとも20 nM、少なくとも30 nM、少なくとも40 nM、少なくとも50 nM、少なくとも60 nM、少なくとも70 nM、少なくとも80 nM、少なくとも90 nM、少なくとも100 nM、少なくとも200 nM、少なくとも300 nM、少なくとも400 nM、少なくとも500 nM、少なくとも600 nM、少なくとも700 nM、少なくとも800 nM、少なくとも900 nM、少なくとも1  $\mu\text{M}$ 、少なくとも2  $\mu\text{M}$ 、少なくとも3  $\mu\text{M}$ 、少なくとも4  $\mu\text{M}$ 、少なくとも5  $\mu\text{M}$ 、少なくとも6  $\mu\text{M}$ 、少なくとも7  $\mu\text{M}$ 、少なくとも8  $\mu\text{M}$ 、少なくとも9  $\mu\text{M}$ 、少なくとも10  $\mu\text{M}$ 、少なくとも20  $\mu\text{M}$ 、少なくとも30  $\mu\text{M}$ 、少なくとも40  $\mu\text{M}$ 、少なくとも50  $\mu\text{M}$ 、少なくとも60  $\mu\text{M}$ 、少なくとも70  $\mu\text{M}$ 、少なくとも80  $\mu\text{M}$ 、少なくとも90  $\mu\text{M}$ または約100  $\mu\text{M}$ の解離定数で結合できる。

20

30

40

### 【0103】

生体試料由来の抗体のペプチドマイクロアレイへの結合のダイナミック・レンジは、結合のシグナルの検出された最大値と最小値の間の比として表される。結合のシグナルは、例えば、二次抗体を用いて検出した蛍光シグナルである。伝統的アッセイは、既定の、狭い結合のダイナミック・レンジにより制限される。本発明の方法およびアレイは、本発明のアレイにおけるペプチドへの抗体の結合を広範なダイナミック・レンジで検出できる。ある態様において、抗体結合の広いダイナミック・レンジは、対数尺度で検出できる。ある態様において、本発明の方法およびアレイは、最大2対数のダイナミック・レンジ、最大3対数のダイナミック・レンジ、最大4対数のダイナミック・レンジまたは最大5対数

50

のダイナミック・レンジを使用する、アレイへの複数の抗体の結合パターンの検出を可能とする。

【0104】

アレイにおける分子の組成は、分子のアレイへの結合アビディティを規定し得る。複数の異なる分子を、健康状態の予防、処置、診断またはモニタリングに使用するアレイに存在させ得る。生体分子の非限定的例は、アミノ酸、ペプチド、ペプチド模倣物、タンパク質、組み換えタンパク質抗体(モノクローナルまたはポリクローナル)、抗体フラグメント、抗原、エピトープ、炭水化物、脂質、脂肪酸、酵素、天然産物、核酸(DNA、RNA、ヌクレオシド、ヌクレオチド、その構造類似体または組み合わせを含む)、栄養素、受容体およびビタミンを含む。ある態様において、アレイにおける分子は、エピトープの構造を模倣し、エピトープ誘発抗体と結合できる分子であるミモトープである。ある態様において、アレイにおける分子は、抗原のエピトープと結合する抗体(またはT細胞受容体)の可変領域中の部位を含む、パラトープまたはパラトープ模倣物である。ある態様において、本発明のアレイは、無作為ペプチド配列を含むペプチドアレイである。

10

【0105】

ペプチドアレイ中の内部アミノ酸(intra-amino acid)距離は、ペプチドマイクロアレイの各ペプチド間の距離である。内部アミノ酸距離は、分子のアレイへのオフターゲット結合および/または結合アビディティに寄与し得る。内部アミノ酸距離は、約0.5 nm、約1 nm、約1 nm、1.1 nm、約1.2 nm、約1.3 nm、約1.4 nm、約1.5 nm、約1.6 nm、約1.7 nm、約1.8 nm、約1.9 nm、約2 nm、約2.1 nm、約2.2 nm、約2.3 nm、約2.4 nm、約2.5 nm、約2.6 nm、約2.7 nm、約2.8 nm、約2.9 nm、約3 nm、約3.1 nm、約3.2 nm、約3.3 nm、約3.4 nm、約3.5 nm、約3.6 nm、約3.7 nm、約3.8 nm、約3.9 nm、約4 nm、約4.1 nm、約4.2 nm、約4.3 nm、約4.4 nm、約4.5 nm、約4.6 nm、約4.7 nm、約4.8 nm、約4.9 nm、約5 nm、約5.1 nm、約5.2 nm、約5.3 nm、約5.4 nm、約5.5 nm、約5.6 nm、約5.7 nm、約5.8 nm、約5.9 nmおよび/または約6 nmであり得る。ある態様において、内部アミノ酸距離は6ナノメートル(nm)未満である。

20

【0106】

内部アミノ酸距離は少なくとも0.5 nm、少なくとも1 nm、少なくとも1 nm、少なくとも1.1 nm、少なくとも1.2 nm、少なくとも1.3 nm、少なくとも1.4 nm、少なくとも1.5 nm、少なくとも1.6 nm、少なくとも1.7 nm、少なくとも1.8 nm、少なくとも1.9 nm、少なくとも2 nm、少なくとも2.1 nm、少なくとも2.2 nm、少なくとも2.3 nm、少なくとも2.4 nm、少なくとも2.5 nm、少なくとも2.6 nm、少なくとも2.7 nm、少なくとも2.8 nm、少なくとも2.9 nm、少なくとも3 nm、少なくとも3.1 nm、少なくとも3.2 nm、少なくとも3.3 nm、少なくとも3.4 nm、少なくとも3.5 nm、少なくとも3.6 nm、少なくとも3.7 nm、少なくとも3.8 nm、少なくとも3.9 nm、少なくとも4 nm、少なくとも4.1 nm、少なくとも4.2 nm、少なくとも4.3 nm、少なくとも4.4 nm、少なくとも4.5 nm、少なくとも4.6 nm、少なくとも4.7 nm、少なくとも4.8 nm、少なくとも4.9 nm、少なくとも5 nm、少なくとも5.1 nm、少なくとも5.2 nm、少なくとも5.3 nm、少なくとも5.4 nm、少なくとも5.5 nm、少なくとも5.6 nm、少なくとも5.7 nm、少なくとも5.8 nmまたは少なくとも5.9 nmであり得る。

30

40

【0107】

内部アミノ酸距離は長くて0.5 nm、長くて1 nm、長くて1 nm、長くて1.1 nm、長くて1.2 nm、長くて1.3 nm、長くて1.4 nm、長くて1.5 nm、長くて1.6 nm、長くて1.7 nm、長くて1.8 nm、長くて1.9 nm、長くて2 nm、長くて2.1 nm、長くて2.2 nm、長くて2.3 nm、長くて2.4 nm、長くて2.5 nm、長くて2.6 nm、長くて2.7 nm、長くて2.8 nm、長くて2.9 nm、長くて3 nm、長くて3.1 nm、長くて3.2 nm、長くて3.3 nm、長くて3.4 nm、長くて3.5 nm、長くて3.6 nm、長くて3.7 nm、長くて3.8 nm、長くて3.9 nm、長くて4 nm、長くて4.1 nm、長くて4.2 nm、長くて4.3 nm、長くて4.4 nm、長くて4.5 nm、長くて4.6 nm、長くて4.7 nm、長くて4.8 nm、長くて4.9 nm、長くて5 nm、長くて5.1 nm、長くて5.2 nm、長くて5.3 nm、長くて5.4 nm、長くて5.

50

5 nm、長くて5.6 nm、長くて5.7 nm、長くて5.8 nm、長くて5.9 nmおよび/または長くて6 nmであり得る。ある態様において、内部アミノ酸距離は長くて6 ナノメートル(nm)である。

【0108】

内部アミノ酸距離は0.5 nm~1 nm、0.5 nm~2 nm、0.5 nm~3 nm、0.5 nm~3 nm、0.5 nm~4 nm、0.5 nm~5 nm、0.5 nm~6 nm、1 nm~2 nm、1 nm~3 nm、1 nm~4 nm、1 nm~5 nm、1 nm~6 nm、2 nm~3 nm、2 nm~4 nm、2 nm~5 nm、2 nm~6 nm、3 nm~4 nm、3 nm~5 nm、3 nm~6 nm、4 nm~5 nm、4 nm~6 nmおよび/または5 nm~6 nmの範囲であり得る。

【0109】

ペプチドアレイは、表面に複数の異なるペプチドパターンを含み得る。ペプチドアレイは、例えば、種々の複数のペプチドおよび/または分子の1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個および/または10個の複製を含み得る。ある態様において、複数の異なるペプチドを、ペプチドアレイの表面に複写で(in replica)スポットする。ペプチドアレイは、例えば、アレイ上に均一に分散した多数のペプチドを含み得る。ペプチドアレイは、例えば、アレイ上に不均一に分散した多数のペプチドを含み得る。

【0110】

ペプチドを、ペプチドアレイに“スポット”し得る。ペプチドスポットは種々の幾何学的形状を有してよく、例えば、ペプチドスポットは円形、方形、矩形および/または三角形であり得る。ペプチドスポットは複数の径を有し得る。ペプチドスポット径の非限定的例は、約3 μm~約8 μm、約3~約10mm、約5~約10mm、約10 μm~約20 μm、約30 μm、約40 μm、約50 μm、約60 μm、約70 μm、約80 μm、約90 μm、約100 μm、約110 μm、約120 μm、約130 μm、約140 μm、約150 μm、約160 μm、約170 μm、約180 μm、約190 μm、約200 μm、約210 μm、約220 μm、約230 μm、約240 μmおよび/または約250 μmである。

【0111】

ペプチドアレイは、多くの異なるペプチドを含み得る。ある態様において、ペプチドアレイは、約10個のペプチド、約50個のペプチド、約100個のペプチド、約200個のペプチド、約300個のペプチド、約400個のペプチド、約500個のペプチド、約750個のペプチド、約1000個のペプチド、約1250個のペプチド、約1500個のペプチド、約1750個のペプチド、約2,000個のペプチド、約2,250個のペプチド、約2,500個のペプチド、約2,750個のペプチド、約3,000個のペプチド、約3,250個のペプチド、約3,500個のペプチド、約3,750個のペプチド、約4,000個のペプチド、約4,250個のペプチド、約4,500個のペプチド、約4,750個のペプチド、約5,000個のペプチド、約5,250個のペプチド、約5,500個のペプチド、約5,750個のペプチド、約6,000個のペプチド、約6,250個のペプチド、約6,500個のペプチド、約7,500個のペプチド、約7,725個のペプチド、約8,000個のペプチド、約8,250個のペプチド、約8,500個のペプチド、約8,750個のペプチド、約9,000個のペプチド、約9,250個のペプチド、約10,000個のペプチド、約10,250個のペプチド、約10,500個のペプチド、約10,750個のペプチド、約11,000個のペプチド、約11,250個のペプチド、約11,500個のペプチド、約11,750個のペプチド、約12,000個のペプチド、約12,250個のペプチド、約12,500個のペプチド、約12,750個のペプチド、約13,000個のペプチド、約13,250個のペプチド、約13,500個のペプチド、約13,750個のペプチド、約14,000個のペプチド、約14,250個のペプチド、約14,500個のペプチド、約14,750個のペプチド、約15,000個のペプチド、約15,250個のペプチド、約15,500個のペプチド、約15,750個のペプチド、約16,000個のペプチド、約16,250個のペプチド、約16,500個のペプチド、約16,750個のペプチド、約17,000個のペプチド、約17,250個のペプチド、約17,500個のペプチド、約17,750個のペプチド、約18,000

10

20

30

40

50

個のペプチド、約 18,250 個のペプチド、約 18,500 個のペプチド、約 18,750 個のペプチド、約 19,000 個のペプチド、約 19,250 個のペプチド、約 19,500 個のペプチド、約 19,750 個のペプチド、約 20,000 個のペプチド、約 20,250 個のペプチド、約 20,500 個のペプチド、約 20,750 個のペプチド、約 21,000 個のペプチド、約 21,250 個のペプチド、約 21,500 個のペプチド、約 21,750 個のペプチド、約 22,000 個のペプチド、約 22,250 個のペプチド、約 22,500 個のペプチド、約 22,750 個のペプチド、約 23,000 個のペプチド、約 23,250 個のペプチド、約 23,500 個のペプチド、約 23,750 個のペプチド、約 24,000 個のペプチド、約 24,250 個のペプチド、約 24,500 個のペプチド、約 24,750 個のペプチド、約 25,000 個のペプチド、約 25,250 個のペプチド、約 25,500 個のペプチド、約 25,750 個のペプチドおよび / または約 30,000 個のペプチドを含む。

10

#### 【0112】

ある態様において、健康モニタリング方法、処置方法、診断方法および状態の予防方法に使用するペプチドアレイは、30,000 個を超えるペプチドを含む。ある態様において、健康モニタリング方法に使用するペプチドアレイは、約 330,000 個のペプチドを含む。ある態様において、アレイは約 30,000 個のペプチド、約 35,000 個のペプチド、約 40,000 個のペプチド、約 45,000 個のペプチド、約 50,000 個のペプチド、約 55,000 個のペプチド、約 60,000 個のペプチド、約 65,000 個のペプチド、約 70,000 個のペプチド、約 75,000 個のペプチド、約 80,000 個のペプチド、約 85,000 個のペプチド、約 90,000 個のペプチド、約 95,000 個のペプチド、約 100,000 個のペプチド、約 105,000 個のペプチド、約 110,000 個のペプチド、約 115,000 個のペプチド、約 120,000 個のペプチド、約 125,000 個のペプチド、約 130,000 個のペプチド、約 135,000 個のペプチド、約 140,000 個のペプチド、約 145,000 個のペプチド、約 150,000 個のペプチド、約 155,000 個のペプチド、約 160,000 個のペプチド、約 165,000 個のペプチド、約 170,000 個のペプチド、約 175,000 個のペプチド、約 180,000 個のペプチド、約 185,000 個のペプチド、約 190,000 個のペプチド、約 195,000 個のペプチド、約 200,000 個のペプチド、約 210,000 個のペプチド、約 215,000 個のペプチド、約 220,000 個のペプチド、約 225,000 個のペプチド、約 230,000 個のペプチド、約 240,000 個のペプチド、約 245,000 個のペプチド、約 250,000 個のペプチド、約 255,000 個のペプチド、約 260,000 個のペプチド、約 265,000 個のペプチド、約 270,000 個のペプチド、約 275,000 個のペプチド、約 280,000 個のペプチド、約 285,000 個のペプチド、約 290,000 個のペプチド、約 295,000 個のペプチド、約 300,000 個のペプチド、約 305,000 個のペプチド、約 310,000 個のペプチド、約 315,000 個のペプチド、約 320,000 個のペプチド、約 325,000 個のペプチド、約 330,000 個のペプチド、約 335,000 個のペプチド、約 340,000 個のペプチド、約 345,000 個のペプチドおよび / または約 350,000 個のペプチドを含む。ある態様において、健康モニタリング方法に使用するペプチドアレイは、330,000 個を超えるペプチドを含む。

20

30

40

#### 【0113】

ペプチドアレイは、多くの異なる個のペプチドを含み得る。ある態様において、ペプチドアレイは、少なくとも 2,000 個のペプチド、少なくとも 3,000 個のペプチド、少なくとも 4,000 個のペプチド、少なくとも 5,000 個のペプチド、少なくとも 6,000 個のペプチド、少なくとも 7,000 個のペプチド、少なくとも 8,000 個のペプチド、少なくとも 9,000 個のペプチド、少なくとも 10,000 個のペプチド、少なくとも 11,000 個のペプチド、少なくとも 12,000 個のペプチド、少なくとも 13,000 個のペプチド、少なくとも 14,000 個のペプチド、少なくとも 15,000 個のペプチド、少なくとも 16,000 個のペプチド、少なくとも 17,000 個のペプチド、少

50

なくとも18,000個のペプチド、少なくとも19,000個のペプチド、少なくとも20,000個のペプチド、少なくとも21,000個のペプチド、少なくとも22,000個のペプチド、少なくとも23,000個のペプチド、少なくとも24,000個のペプチド、少なくとも25,000個のペプチド、少なくとも30,000個のペプチド、少なくとも40,000個のペプチド、少なくとも50,000個のペプチド、少なくとも60,000個のペプチド、少なくとも70,000個のペプチド、少なくとも80,000個のペプチド、少なくとも90,000個のペプチド、少なくとも100,000個のペプチド、少なくとも110,000個のペプチド、少なくとも120,000個のペプチド、少なくとも130,000個のペプチド、少なくとも140,000個のペプチド、少なくとも150,000個のペプチド、少なくとも160,000個のペプチド、少なくとも約170,000個、少なくとも180,000個のペプチド、少なくとも190,000個のペプチド、少なくとも200,000個のペプチド、少なくとも210,000個のペプチド、少なくとも220,000個のペプチド、少なくとも230,000個のペプチド、少なくとも240,000個のペプチド、少なくとも250,000個のペプチド、少なくとも260,000個のペプチド、少なくとも270,000個のペプチド、少なくとも280,000個のペプチド、少なくとも290,000個のペプチド、少なくとも300,000個のペプチド、少なくとも310,000個のペプチド、少なくとも320,000個のペプチド、少なくとも330,000個のペプチド、少なくとも340,000個のペプチド、少なくとも350,000個のペプチドを含む。ある態様において、健康モニタリング方法に使用するペプチドアレイは、少なくとも330,000個のペプチドを含む。

#### 【0114】

ペプチドは、リンカー分子によりペプチドアレイに物理的に拘束されていてよいペプチドのN末端またはC末端をリンカー分子と結合できる。リンカー分子は、例えば、イミド官能基、アミン官能基、ヒドロキシル官能基、カルボキシル官能基、アルデヒド官能基および/またはスルフヒドリル官能基のような、アレイの表面に存在する複数性官能基(functional plurality)の分子であり得る。リンカー分子は、例えば、ポリマーであり得る。ある態様において、リンカーはマレイミドである。ある態様において、リンカーはグリシン-セリン-システイン(GSC)またはグリシン-グリシン-システイン(GGC)リンカーである。ある態様において、リンカーは、種々の長さまたは組成のポリペチドからなる。ある場合、リンカーは種々の長さのポリエチレングリコールである。さらに他の場合、リンカーは、ヒドロキシメチル安息香酸、4-ヒドロキシ-2-メトキシベンズアルデヒド、4-スルファモイル安息香酸またはペプチドを固形基質に結合させるのに適する他のものである。

#### 【0115】

ペプチドアレイの表面は複数の異なる材料を含み得る。ペプチドアレイの表面は、例えば、ガラスであり得る。ペプチドアレイの表面を構成し得る材料の非限定的例は、ガラス、官能基化ガラス、ケイ素、ゲルマニウム、ガリウムヒ素、ガリウムリン、二酸化ケイ素、酸化ナトリウム、シリコン窒化物、ニトロセルロース、ナイロン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンジフルオリド、ポリスチレン、ポリカーボネート、メタクリレートまたはこれらの組み合わせを含み得る。

#### 【0116】

ペプチドアレイの表面は平面でも、凹面でも、凸面でもよい。ペプチドアレイの表面は均一であってよく、アレイの表面は不均一であってよい。ある態様において、ペプチドアレイの表面は平面である。

#### 【0117】

ペプチドアレイの表面をコーティングで被覆してよい。コーティングは、例えば、本発明のアレイの接着能を改善できる。コーティングは、例えば、生体試料の本発明のアレイへの背景接着を減少できる。ある態様において、本発明のペプチドアレイは、アミノシランコーティングされたスライド・ガラスを含む。

#### 【0118】

10

20

30

40

50

ペプチドアレイは、複数の寸法を有し得る。ペプチドアレイはペプチドマイクロアレイであり得る。

【0119】

#### アレイの製造

上記ペプチドアレイのような複合的バイオアレイを製造するためのパターンニング技術を容易にするための方法もここに開示する。既存の方法は、表面上の規定位置にヘテロポリマーのライブラリーを製造するためのリソグラフィーまたは他のパターンニング技術の使用が実現の可能性があることを示している。本方法は、DNAおよびペプチドアレイに広範に適用されている。最も単純な手法は、層状のヘテロポリマーのライブラリーの製造である。M個のモノマーの配列からなる長さNのヘテロポリマーで論じる。一般に、層あたりパターンニングがM工程あり、各モノマーあたり1工程である。N長の配列では、N層のパターンニングとなる。パターンニング工程の総数は、それゆえにN×Mである。

【0120】

パターンニングの他の面は、二進法事象であることである。換言すると、各パターンニング工程における表面の任意領域は“露出”または“非露出”であり、ここで、露出は、パターンニングに使用する放射、化学、エフェクターまたは力がどんなものであれそれに対する。この方法でのアッセイのパターンニングは、 $M^N$ の可能性の配列空間を $2^R$ (ここで、Rはパターンニング工程の総数である)の可能性の二進法空間に投影することである。原則として、Rの最小値は、二つの発現を等しく設定したときに与えられ、質問の回答は

【数1】

$$R = N \frac{\ln M}{\ln 2}$$

に至る。

【0121】

これは、 $M^N$ 空間の何らかのヘテロポリマーを、 $2^R$ 空間における一連のパターンニング工程により表すことが可能であることを願うならば、パターンニング工程の理論的最小値を表す。層毎のアルゴリズム(M×N)のパターンニング工程数と上記Rの最小値を比較でき、下記表1に示す。

【表1】

N \ M	10		11		12		13		14		15	
	MxN	R	MxN	R	MxN	R	MxN	R	MxN	R	MxN	R
8	80	27	88	28	96	29	104	30	112	30	120	31
9	90	30	99	31	108	32	117	33	126	34	135	35
10	100	33	110	35	120	36	130	37	140	38	150	39
11	110	37	121	38	132	39	143	41	154	42	165	43
12	120	40	132	42	144	43	156	44	168	46	180	47
13	130	43	143	45	156	47	169	48	182	49	195	51
14	140	47	154	48	168	50	182	52	196	53	210	55
15	150	50	165	52	180	54	195	56	210	57	225	59
16	160	53	176	55	192	57	208	59	224	61	240	63
17	170	56	187	59	204	61	221	63	238	65	255	66
18	180	60	198	62	216	65	234	67	252	69	270	70
19	190	63	209	66	228	68	247	70	266	72	285	74
20	200	66	220	69	240	72	260	74	280	76	300	78

【表 2】

表1、パート 2											
N	M	16		17		18		19		20	
		MxN	R	MxN	R	MxN	R	MxN	R	MxN	R
	8	128	32	136	33	144	33	152	34	160	35
	9	144	36	153	37	162	38	171	38	180	39
	10	160	40	170	41	180	42	190	42	200	43
	11	176	44	187	45	198	46	209	47	220	48
	12	192	48	204	49	216	50	228	51	240	52
	13	208	52	221	53	234	54	247	55	260	56
	14	224	56	238	57	252	58	266	59	280	61
	15	240	60	255	61	270	63	285	64	300	65
	16	256	64	272	65	288	67	304	68	320	69
	17	272	68	289	69	306	71	323	72	340	73
	18	288	72	306	74	324	75	342	76	360	78
	19	304	76	323	78	342	79	361	81	380	82
	20	320	80	340	82	360	83	380	85	400	86

10

20

## 【0122】

層毎の手法に含まれる工程数は、二進法表示の理論的最小値と比較して極めて大きい。通常のフォトリソグラフィ処理下で、各アミノ酸を別々に添加し、それゆえに、この手法を使用して異なるアミノ酸を選別するであろう二進コードを直接インプリントする方法がないことが問題である。しかしながら、一度に1層にのみアミノ酸を添加することも不要であり、必要なサイクル数を顕著に変化させる。

## 【0123】

本発明の新規パターンニング方法を以下に記載する。例示的態様において、10種のモノマーを使用して形成したヘテロポリマーのレイを使用し、ヘテロポリマーを形成するためのモノマーのパーセンテージは等しく、すなわち、各モノマーにつき10%である。第一パターンニング工程はモノマーAを添加する、すなわちヘテロポリマーの10%は第一層にAを有する。第二工程はモノマーBと見なす。この態様において、第一層に割り当てられたモノマーの10%はBを有するが、さらに、現在利用可能な第二層の10%(すなわち、第一層でAを受けた10%)はまたBモノマーを受け準備ができています。それゆえに、Bは実際に総アミン部位の11%と結合する。モノマーCを添加する第三工程で、第一層としてCを受ける10%のヘテロポリマーと、第二層の10%の部位および既にAおよびBのいずれも添加されている第三層のために新しく開いた10%の部位がある。この方法を継続し、最終的に表面上の各モノマーが、層あたり特定のモノマーを10%しか添加していなくても、利用可能なアミンが20%に近づいたレベルで安定化させる。これは、層毎の合成と比較して、特定の工程数で製造されるポリマーの平均長を約2倍増やす。

30

40

## 【0124】

本方法をアルゴリズム形態で述べるができる。簡単にいうと、本方法は、再帰的に次モノマーを順番に命令した配列が利用可能な全層に付加する。特定の順番で、1サイクルのモノマーを何度も繰り返したとき、アルゴリズムは最大効果を有する。一般に、アルゴリズムは次の方法で働く。

- ・ ヘテロポリマーを製造するための一連のモノマーの選択。
- ・ 層あたり(残基あたり)カバーされている付加部位(例えば、ペプチド合成におけるアミン)の比の各モノマーへの割り当て。

50

一つの態様において、比を  $1 / (\text{モノマー数})$  となるよう選択する。

他の態様において、モノマーは合計  $100\%$  となる種々の比を有する。

他の態様において、疑似無作為ペプチド配列を作製するとき、モノマーと関係する比は  $100\%$  を超えてよい。

- ・ 疑似無作為または無作為配列の使用を含む、一連の所望のヘテロポリマー配列の製造。
- ・ パターン化化学方法の使用：ヘテロポリマーのどの残基の位置が付加のために利用可能であるかに関係なく、所望の配列に従いペプチドを正確に伸長するであろう全位置にモノマーを一度に添加。

一つの態様において、本工程は、予定された順番でのモノマーにわたる循環を含む。これは、最小数のパターンニング工程で最長ペプチドをもたらす。

各サイクルでの順番または付加は変えてもよく、または完全に無作為でもよいが、無作為の順番のパターンニングは、特定の平均長を達成するために必要なパターンニング工程数を増やす。

【0125】

上記の比の割り当てを前提とすれば、何れかの特定の層があるモノマーの一定の比のみを持つ場合でも、このアルゴリズムを使用したパターンニング工程で付加される実際の比はそれより可成り高い。パターンニング工程における付加モノマー量を次のとおり評価できる。 $f_j$  は特定のモノマーを付加した層の比を意味するとする。全層に付加されたモノマーの比の全ての合計は

【数2】

$$\left( f_i \sum_{j=i-Z}^{i-1} f_j \right) + f_i$$

〔式中、 $i$  は現在のパターンニング工程数であり； $Z$  は、現在のモノマーを最後に添加したとき以来添加した異なるモノマーの数である。〕

となり、それゆえに、合計は、現在のモノマーを最後に添加したとき以来添加された全モノマーに関する層辺りの比を超える。

【0126】

例示的態様をここに示す。この場合、16アミノ酸を所定の10,000ペプチド配列の構築に使用する。図27は、パターンニング工程数の関数として合成したペプチドの平均長を示す。Y軸は平均ペプチド長であり、X軸はパターンニングサイクル数である。ほぼ全ての数のパターンニングサイクルに関して、最適化モデルは、約2倍製造効率を改善していることが解る。

【0127】

本発明を使用する疑似無作為ペプチドを製造するための他の手法は、この方法を使用してコンピューター的に極めて多数のペプチド配列を製造することであるが、そうであれば、アレイの生産に最長の1個を含むだけである。この手法は、アミノ酸が添加された順番に類する順番を有する配列へのバイアスをもたらす(一般に連続的ではないが)。得られた配列は、なお大量の空間を被覆し、無作為の程度は実施者がどの分散の比を選択するかによる。図30を参照して、16種のアミノ酸を使用した最適化アルゴリズムの70工程に由来する分散の態様を下に記載する。これらの配列の上位5%は平均約12残基長であり、アレイの実際の合成のために選択でき、他の配列を廃棄する。パターンニング工程数を60まで減らしたら、最長ペプチドの0.5%の選択によりほぼ同一平均ペプチド長を得ることができる。再び、使用するパターンニング工程数が少ないと、ペプチドのライブラリーに大きな配列バイアスがかかるが、あるバイアスが許容できる程度まで、パターンニング工程数を大きく減らしてよい。

【0128】

ある態様において、本発明の使用は、100あまりのパターンニング工程で、16種の酸

10

20

30

40

50

を使用して12残基の平均長を有する規定配列のペプチドのアレイを製造できる。しかしながら、特異的集合の配列で特異的集合のヘテロポリマーの製造を試みる態様では、各配列の最後まで本質的にM×Nパターンニング工程まで到達しなかった。配列画分が予定より1または2モノマー短く終了する態様において、我々は、M×Nよりはるかに少ない工程で配列を製造できた。図28は、標準的な層毎のアプローチと最適化アルゴリズムを使用した全20アミノ酸を使用した結果を示す。

#### 【0129】

他の態様は、間にヒトプロテオームのような全プロテオームをカバーする重複ペプチド配列の製造を考慮する。エピトープの発見またはタンパク質または小分子の結合部位を同定するためにこのようなアレイを使用できる。直鎖状エピトープを、例えば、3～5アミノ酸重複を伴う12～15残基長のペプチドのアレイを使用して同定できる。このようなアレイを製造するために、表面上にさらに数百万のペプチドを必要とする。これは、最適化アルゴリズムを使用して約140工程、層毎の手法を使用して260手順を必要とする平均長13残基のアレイの製造により達成される。

10

#### 【0130】

ここに開示したアレイを上記免疫署名と共に使用できる。免疫署名と共に使用するとき、アレイ上の多様な長さのペプチドが許容され、また望ましいこともある。平均12残基のペプチドおよび16種のアミノ酸の使用が、免疫署名についてうまく機能することが示されており、図27に示すとおり、このようなペプチドの無作為アレイを、100あまりのパターンニング工程で製造できる。対照的に、層毎の合成には192工程を要する。

20

#### 【0131】

免疫署名の使用はまた完全には無作為ではないペプチドを用いても効果的に達成できる。純粋に無作為なものより少ない工程で疑似無作為ペプチドを製造するためにこのアルゴリズムを使用するには2つの方法がある。16タイプのモノマー、すなわちアミノ酸を使用するアレイの例を考える場合、16個ではなく8個のみのアミノ酸を使用するようにアミノ酸サイクルを単純化できるが、その後、使用した8アミノ酸の複数セットを交互に使用する。このモノマー付加方法は、シリーズの最初の少ないアミノ酸が、最初の8個のセットへのバイアスがかかることを意味する。最終的に、バイアスは減っていくが、完全には消失しない。図29はこの態様の結果を示し、60回未満の工程で平均12残基長を達成できる。

30

#### 【0132】

##### 検出

試料成分とアレイの結合相互作用を多様な形式で検出できる。いくつかの形式において、試料成分を標識する。標識はとりわけ放射性同位体または色素であり得る。標識は、試料を得る前に標識を患者に投与することにより、または試料もしくはその中の選択的成分に標識を結合させることにより、供給できる。

#### 【0133】

結合相互作用を、抗体のような二次検出剤を使用しても検出できる。例えば、試料中の抗体のアレイへの結合を、抗体のアイソタイプ(例えば、IgG(IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4のようなあらゆるサブタイプを含む)、IgA、IgM)に特異的な二次抗体を使用して検出できる。二次抗体は、通常標識され、特定のアイソタイプの解析する試料中の全抗体と結合できる。種々のアイソタイプ特性を有する種々の二次抗体を使用できる。同一試料中の種々のアイソタイプの抗体が結合する化合物が実質的に重複することはしばしばあるが、プロファイルの差異もある。

40

#### 【0134】

結合相互作用を、表面プラズモン共鳴(SPR)およびマススペクトロメトリーのような無標識方法を使用しても検出できる。SPRは、解離定数および解離速度の指標を提供できる。例えば、A-100 Biocore/GE装置がこのタイプの解析に適する。FLEXchipsを使用して、同一支持体上の最大400の結合反応を分析できる。

#### 【0135】

50

所望により、試料成分とアレイの結合相互作用を競合形式で検出できる。結合の競合的阻害剤の存在下および非存在下の、アレイの試料への結合プロファイルの差異は、試料の特徴付けに有用であり得る。競合的阻害剤は、例えば、病原体または病原体に対する抗体のような疾患状態と関係する既知タンパク質であり得る。このような競合剤存在下でのアレイのメンバーの試料への結合の減少は、病原体の存在を示す。ライブラリーメンバーを標的と接触させるときの塩、イオン強度、有機溶媒含量および温度を変えることによりストリンジエンシーを調節できる。

#### 【0136】

酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)のような抗体ベースの検出方法を使用して、本発明のアレイへの結合パターンを検出できる。例えば、免疫グロブリンの特定のアイソタイプ、例えばIgMアイソタイプを検出する二次抗体を使用して、対象の複合的生体試料からの複数のIgM抗体のアレイへの結合パターンを検出できる。二次抗体は、例えば蛍光基または放射性標識のような検出可能標識に結合してよい。

10

#### 【0137】

本発明は、複数の異なる抗体の本発明のアレイへのオフターゲット結合を検出するためのアレイおよび方法を提供する。複合的生体試料中の複数の抗体は、ペプチドマイクロアレイの多数のペプチドとオフターゲット結合できる。ある態様において、少なくとも1抗体のペプチドアレイ中の多数のペプチドへのオフターゲット結合の検出が免疫署名を形成し得る。抗体の複数クラスまたはアイソタイプは、アレイのオフターゲット結合パターンを提供できる。抗体または免疫グロブリンはIgA、IgD、IgE、IgGおよび/またはIgM抗体であり得る。

20

#### 【0138】

複合的生体試料からの少なくとも1個のIgM抗体のペプチドアレイへの結合パターンは免疫署名を形成できる。IgM抗体は、複数免疫グロブリンが互いにジスルフィド結合により共有結合しているポリマーを形成できる。IgMポリマーは五量体であり得る。IgMアイソタイプに備わった抗体の多量体性質は、試料のアレイへのオフターゲット結合を増やし得る。抗体の多量体性質は、試料のアレイへの結合アビディティを高め得る。例えば、多量体IgMアイソタイプ抗体である抗体のペプチドマイクロアレイへの結合パターンは、独特な五量体誘導免疫署名を形成できる。

30

#### 【0139】

IgA抗体はIgA1またはIgA2抗体であり得る。IgAアイソタイプの抗体は二量体を形成できる。IgG抗体はIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4抗体であり得る。IgGアイソタイプ抗体は単量体として存在する。IgDおよび/またはIgE抗体は単量体を形成できる。ある態様において、本発明は、対象の複合的生体試料からの少なくとも1個のIgM抗体のペプチドアレイへのオフターゲット結合を検出できる。

40

#### 【0140】

#### 対象の生涯にわたる対象のモニタリング

本発明の方法、デバイス、キット、アレイおよびシステムは、対象の生涯にわたり対象をモニタリングするのに使用できる。対象の生涯は生まれてから対象に何が起きているかを意味し得る。本発明の方法、アレイ、キットおよびシステムでの対象の健康のモニタリングは、対象のカルテまたは電子カルテ(EMR)に含ませてよい。

40

#### 【0141】

電子カルテ(EMR)は、対象の医師、臨床医、保険会社、病院および/または対象が患者である他の施設により得られ、保存された記録に関し得る。ある態様において、医師は医師、歯科医、検眼士、セラピスト、カイロプラクターおよび対象に医療サービスを提供する誰かであり得る。電子カルテ(EMR)は、例えば、CATスキャン、MRI、超音波、血糖値、診断法、アレルギー、臨床検査結果、EKG、投薬、デイリーチャート、投与薬、身体検査、入院時看護記録、看護計画、照会、現在および過去の症状、病歴、ライフスタイル、身体検査結果、試験、方法、処置、投薬、退院、歴史、日記、問題、所見、免疫処置、入院時診療記録、申し送り記録、経過記録、術前記録、手術記録、術後記録、治

50

療記録、分娩記録、分娩後記録および退院記録を含み得る。

【0142】

#### 処置および状態

本発明のアレイおよび方法は、例えば、対象の複数の異なる状態の診断、モニタリング、特徴づけおよび処置指針として使用できる。対象はヒト、モルモット、イヌ、ネコ、ウマ、マウス、ウサギおよび種々の他の動物であってよい。対象はあらゆる年齢であってよく、例えば、対象は乳児、幼児、小児、少年期、青年期、成人または高齢者であり得る。

【0143】

対象の状態は、疾患状態または健康な状態に対応し得る。ある態様において、対象の状態は健康な状態であり、本発明の方法は健康な状態をモニタリングする。ある態様において、対象の状態は疾患状態であり、本発明の方法を状態および/または該状態の進行の診断/モニタリングに使用する。本発明の方法はまた状態の予防にも使用できる。ある態様において、本発明の方法を予防処置と共に使用する。

10

【0144】

ここに開示するアレイデバイスおよび方法は、重要なことに多様な疾患および/または状態を同時に検出かつモニタリングする。例えば、ここに開示するアレイデバイスおよび方法は、同一アレイで炎症状態、癌疾患および病原性感染を同時に検出できる。したがって、わずか1個のアレイしか、すなわち1個の免疫署名アッセイしか、広範な疾患および状態の検出に必要なではない。それゆえに、対象の生涯にわたるモニタリングは、実施した全免疫署名により、対象の健康状態の時系列のスナップショットを提供する。これは、対象の健康状態の包括的なおよび特異的な変化を検出する強力な手段となり、免疫署名アッセイの高感度と共に、個々の健康状態の何らかの変化の極めて早期の段階での検出が可能なシステムを提供する。

20

【0145】

したがって、ここに開示する方法、システムおよびアレイデバイスは、疾患および/または状態の早期段階で、疾患および/または状態の検出、診断、モニタリング、予防および/または処置ができる。例えば、ここに開示する方法、システムおよびアレイデバイスは、従来のバイオマーカーベースのアッセイより数日または数週間早く、疾患および/または状態を検出、診断およびモニタリングできる。さらに、わずか1個のアレイ、すなわち、1個の免疫署名アッセイしか、炎症状態、癌および病原性感染症を含む広範な疾患および状態の検出、診断およびモニタリングに必要なとしない。

30

【0146】

本発明のアレイおよび方法はまた、例えば、癌の診断、モニタリング、予防および/または処置にも使用できる。本発明のアレイおよび方法で診断、モニタリング、予防および/または処置できる癌の非限定的例は、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄球性白血病、副腎皮質癌、AIDS関連癌、AIDS関連リンパ腫、肛門癌、虫垂癌、星状細胞腫、基底細胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨の癌、脳腫瘍、例えば小脳星状細胞腫、脳星状細胞腫/悪性神経膠腫、上衣腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、視覚路および視床下部神経膠腫、乳癌、気管支腺腫、パーキットリンパ腫、原発不明癌、中枢神経系リンパ腫、小脳星状細胞腫、子宮頸部癌、小児癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性障害、結腸癌、皮膚T細胞リンパ腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、子宮内膜癌、上衣腫、食道癌、ユーイング肉腫、胚細胞腫瘍、胆嚢癌、胃癌、消化器カルチノイド腫瘍、消化器間質腫瘍、神経膠腫、ヘアリー細胞白血病、頭頸部癌、心癌、肝細胞(肝臓)癌、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、眼内黒色腫、島細胞癌、カポジ肉腫、腎癌、喉頭癌、口唇および口腔癌、脂肪肉腫、肝癌、肺癌、例えば非小細胞および小細胞肺癌、リンパ腫、白血病、マクログロブリン血症、骨の悪性線維性組織球腫/骨肉腫、髄芽腫、黒色腫、中皮腫、原発不明の転移扁平上皮頸部癌、口腔の癌、多発性内分泌腫瘍症候群、骨髄異形成症候群、骨髄球性白血病、鼻腔および副鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞性肺癌、口腔癌、中咽頭癌、骨肉腫/骨の悪性線維性組織球腫、卵巣癌、卵巣上皮癌、卵巣胚細胞腫瘍、膵癌、膵癌島細胞、副鼻腔および鼻腔癌、副甲状腺癌、陰茎癌、

40

50

咽頭癌、褐色細胞腫、松果体星状細胞腫、松果体胚細胞腫、下垂体腺腫、胸膜肺芽細胞腫、血漿細胞腫瘍、原発性中枢神経系リンパ腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌、腎盂および輸尿管移行細胞癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、皮膚癌のメルケル細胞、小腸癌、軟組織肉腫、扁平上皮細胞癌、胃癌、T細胞リンパ腫、咽頭、胸腺腫、胸腺癌、甲状腺癌、栄養膜腫瘍(妊娠性)、原発部位未知癌、尿道癌、子宮肉腫、膣癌、外陰癌、ワルデンストレームマクログロブリン血症およびウィルムス腫瘍を含み得る。

【0147】

ある態様において、本発明の方法は、免疫系が関係する状態を診断、モニタリング、予防および/または処置できる。免疫系が関係する障害の非限定的例は、自己免疫障害、炎症性疾患、HIV、リウマチ性関節炎、I型糖尿病、全身性エリテマトーデス、強皮症、多発性硬化症、重症複合免疫不全(SCID)、ディジョージ症候群、毛細血管拡張性運動失調症、季節性アレルギー、通年性アレルギー、食物アレルギー、アナフィラキシー、肥満細胞症、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、パーキンソン、アルツハイマー、脾機能亢進、白血球粘着不全症、X連鎖型リンパ増殖性疾患、X連鎖型無ガンマグロブリン血症、選択的免疫グロブリンA不全症、高IgM症候群、自己免疫性リンパ増殖性症候群、ウスコット・アルドリッチ症候群、慢性肉芽腫性疾患、分類不能型免疫不全症(CVID)、高免疫グロブリンE症候群および橋本甲状腺炎を含み得る。

10

【0148】

本発明は状態の予防方法を提供でき、該方法は、a) 対象から複合的生体試料を得て； b) 該複合的生体試料をペプチドアレイと接触させ、ここで、該ペプチドアレイは複合的生体試料中の少なくとも1種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、 c) 該複合的生体試料の複数の異なるペプチドへのオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成し、 d) 該免疫署名と状態を関連させ、そして e) 該状態のための処置を受けることを含む。

20

【0149】

ある態様において、本発明の方法は予防処置と組み合わせて使用できる。例えば、ワクチンが予防処置であり得る。予防処置として機能するワクチンの非限定的例は、ポリオワクチン、天然痘ワクチン、麻疹ワクチン、ムンプスワクチン、ヒト乳頭腫ウイルス(HPV)ワクチンおよびインフルエンザワクチンを含む。ある態様において、本発明の方法を、例えば、予防ワクチンに対する対象の応答のモニタリングに使用できる。

30

【0150】

ある態様において、本発明は、処置を提供する方法を提供し、該方法は、a) 対象から複合的生体試料を入手し、 b) 該複合的生体試料をペプチドアレイと接触させ、ここで、該ペプチドアレイは該生体試料中の少なくとも1種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、 c) 該抗体の複数の異なるペプチドへのオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成し、 d) 該免疫署名と状態を関連させ、そして e) 該状態に対する処置を提供することを含む。

【0151】

ある態様において、本発明は診断方法を提供でき、該方法は、a) 対象から複合的生体試料を入手し、 b) 該複合的生体試料をペプチドアレイと接触させ、ここで、該ペプチドアレイは該生体試料中の少なくとも1種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、 c) 該複合的生体試料の一群の種々のペプチドへのオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成し、そして d) 該免疫署名に基づき状態を診断することを含む。

40

【0152】

ある態様において、本発明の方法は、状態の診断、モニタリングおよび処置方法として提供できる。状態の処置方法は、対象の状態または疾患の処置を目的とした治療剤の処方が必要とし得る。ある態様において、治療剤は、約1mg~約2000mg、約5mg~約10000mg、約10mg~約5000mg、約50mg~約2500mg、約100mg~約2000mg、約1mg~約50mg、約50mg~約1000mg、約100mg~約1500mg、約1500mg~約2000mg、約2000mg~約2500mg、約2500mg~約3000mg、約3000mg~約3500mg、約3

50

50 mg ~ 約 400 mg、約 400 mg ~ 約 450 mg、約 450 mg ~ 約 500 mg、約 500 mg ~ 約 550 mg、約 550 mg ~ 約 600 mg、約 600 mg ~ 約 650 mg、約 650 mg ~ 約 700 mg、約 700 mg ~ 約 750 mg、約 750 mg ~ 約 800 mg、約 800 mg ~ 約 850 mg、約 850 mg ~ 約 900 mg、約 900 mg ~ 約 950 mg または 約 950 mg ~ 約 1000 mg の範囲で処方され得る。

#### 【0153】

ある態様において、少なくとも 1 mg、少なくとも 5 mg、少なくとも 15 mg、少なくとも 15 mg、少なくとも 20 mg、少なくとも 25 mg、少なくとも 30 mg、少なくとも 35 mg、少なくとも 40 mg、少なくとも 45 mg、少なくとも 50 mg、少なくとも 55 mg、少なくとも 60 mg、少なくとも 65 mg、少なくとも 70 mg、少なくとも 80 mg、少なくとも 85 mg、少なくとも 90 mg、少なくとも 100 mg、少なくとも 150 mg、少なくとも 200 mg、少なくとも 250 mg、少なくとも 300 mg、少なくとも 350 mg、少なくとも 400 mg、少なくとも 450 mg、少なくとも 500 mg、少なくとも 550 mg、少なくとも 600 mg、少なくとも 650 mg、少なくとも 700 mg、少なくとも 750 mg、少なくとも 800 mg、少なくとも 850 mg、少なくとも 900 mg、少なくとも 950 mg または 少なくとも 1000 mg の治療剤が処方される。

10

#### 【0154】

本発明のアレイおよび方法は使用者により使用できる。複数の使用者が、状態の発症をモニタリング、診断、処置または予防するために本発明の方法を使用できる。使用者は、例えば、自分の健康をモニタリングすることを望む人であり得る。使用者は、例えば、健康管理提供業者であり得る。健康管理提供業者は、例えば、医師であり得る。ある態様において、使用者は、対象を看護する健康管理提供業者である。本発明の使用者であり得る医師および健康管理提供業者の非限定的例は、麻酔科医、肥満外科手術専門家、血液貯蔵輸血医学専門家、心臓電気生理学者、心臓外科医、心臓病専門医、看護助手、臨床的心臓電気生理学専門家、臨床的神経生理学専門家、専門看護師、結腸直腸外科医、救命医療専門家、救命医療外科専門医、歯科衛生士、歯科医、皮膚科医、救命士、救急医療医、消化器外科医、血液学者、ホスピスケアおよび緩和医療専門家、ホメオパシー専門家、感染性疾患専門家、内科医、顎顔面外科医、医療助手、検察医、遺伝医学者、腫瘍内科医、助産師、新生児 - 周産期専門家、腎臓学者、神経学者、神経外科医、核医学専門家、看護師、上級看護師、産科医、腫瘍学者、口腔外科医、矯正歯科医、整形外科専門家、疼痛管理専門家、病理学者、小児科医、灌流技師、歯周治療専門医、形成外科医、足病医、肛門科医、装具専門家、精神医学者、呼吸器科医、放射線科医、外科医、胸部専門家、移植専門家、血管専門家、血管外科医および獣医師を含み得る。本発明のアレイおよび方法で確認した診断を対象のカルテに含ませてよい。

20

30

#### 【0155】

##### キット

本発明のデバイスをキットとして包装できる。ある態様において、キットはデバイス使用のための指示書を含む。書類は、例えば、ラベルであり得る。書類は、投与の方法の条件を示唆し得る。指示は、対象およびモニタリング医に、治療実施により最適臨床的アウトカムを達成するための最良の指導を提供する。

40

#### 【実施例】

#### 【0156】

##### 実施例 1 : 癌の診断方法としての免疫署名

次の実施例は、本発明のアレイの例を用いる癌の診断方法を示す。本実施例では、複数の対象から、複数の異なる場所で採取した生体試料で本発明の方法を試験した、試験番号 1 および試験番号 2 の 2 試験を記載する。

#### 【0157】

##### ペプチドアレイ

種々の配列を含む、10,000個の非天然配列ペプチドの2種のライブラリーを2種のペプチドアレイにプリントした。ペプチドアレイ # 1 は 10,420 ペプチドを含み、

50

試験番号1として実験的に試験した。ペプチドアレイ#2は10,286ペプチドを含み、試験番号2として実験的に試験した。

【0158】

ライブラリー1は、1枚のスライド上で2個の完全なアッセイが利用可能であるが、アッセイあたりの配列あたり単一ペプチドしか利用可能でないようにプリントした。ライブラリー1スライドを、各チャンパーに分けたフレキシブルガセット(Agilent, Santa Clara, CA)を備えた2個の物理的に分かれたチャンパーに区画化した。ライブラリー2は2個のペプチドをプリントしたが、スライドあたりアッセイしか利用可能ではない。

【0159】

試験番号1のペプチドはSigma Genosys(St. Louis, MO)および試験番号2のペプチドはAlta Biosciences(Birmingham, UK)が、アミン末端(試験番号1)またはカルボキシ末端(試験番号2)の一般的GSCリンカーと続く17個の完全に無作為化したアミノ酸を用いて合成した。

10

【0160】

アレイを、非接触ピエゾプリント技術を使用して、Applied arrays(Tempe, AZ)によりアミノシラン被覆スライド・ガラス(Schott, Jena, Germany)にプリントした。アレイを遮断緩衝液(BB=10nMリン酸緩衝化食塩水、pH7.3および0.5%BSA[Sigma Aldrich]、0.5%Tween)で1時間プレインキュベートし、1:500希釈の血清を試料緩衝液(SB=0.5%TweenのないBB)で1時間、25でインキュベートする。スライドを5nMのAlexaFluor 647結合抗ヒト二次(Rockland Antibodies, Gilbertsville, PA)に、1時間、SB中、25で曝し、SBで3回、続いて18MΩ水で5回洗浄し、1800gで5'遠沈させて、乾燥する。アレイをAgilent 'C'スキャナーで、高レーザー出力および70%PMTを使用して、10um解像度で647nmでスキャンする。TIFF画像をペプチド名と強度を結びつける対応するgalファイルと連携させる。

20

【0161】

#### 研究設計および生体試料

制御された実験を、癌診断について免疫署名システムを試験するために設計した。試験番号1は、古典的一連/盲検試験パラダイムを使用して、疾患あたり2~3の異なるコホートから採取した少数の試料を試験する。試験番号2は、多数の採取場所由来の不均衡な多様なコホートからなる、数年にわたり処理した多数の疾患試料の交差検定である。

30

【0162】

試験番号1の研究設計および生体試料：盲検式の一連試験の治験を、各5個の異なる癌と20の他の点では健常な対照を使用して、20個の非盲検式トレーニング試料の3個の技術的反復製造した。サイズを同等にした試験コホートを、盲検のままの試料のみ選択する以外、同じ無作為選択方法を使用して製造した。採取場所、採取日、年齢および性別を無作為化した。試料は、各2~10mlの静脈採血による血清または血漿であり、種々の時間-20で保存した。試料を表2にさらに記載する。試料を複数の異なる場所で採取しており、その略語は次のとおりである：ASU: Arizona State University collection, Tempe, AZ; BNI: Barrow Neurological Institute, St. Joseph's Hospital and Medical Center, Phoenix, AZ; CC: Cleveland Clinic, Cleveland, OH; FHCR: Fred Hutchison Cancer Research Center, Seattle, WA; MSKCC: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY; MMRF: Multiple Myeloma Research Foundation, Norwalk, CT; MS: Mt. Sinai Hospital, New York, NY; PCRT: Pancreatic Cancer Research Team, Phoenix, AZ; UTSW: University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX; UCI: University of California Irvine, Irvine, CA; UPitt: University of Pittsburgh Dept. of Immunology, Pittsburgh, PA; およびUW: University of Washington Medical Center, Seattle, WA。表2では、共同研究者が採取を、しばしば種々の場所で採取した。略語は共同研究者がどこ出身かである。

40

## 【表 3】

表 2

疾患、健康状態	トレーニング	試験	採取場所
健常対照	20	20	ASU、PCRT、FHCRC、UTSW
多形神経膠芽腫	20	20	BNI
膵癌	20	20	CC、PCRT、UW
肺癌	20	20	FHCRC
多発性骨髄腫	20	20	MMRC
乳癌	20	20	ASU、FHCRC、UTSW

10

## 【0163】

進行性膵癌(PC)、未処置多形神経膠芽腫(侵襲型の星状細胞腫)(GBM)、食道腺癌(EC)、多発性骨髄腫(MM)およびステージIV乳癌(BC)の患者からの20個の無作為に選択した血清試料を試験番号1で試験し、同時に20個の混合した‘非疾患’対照(表2)も試験した。表2は、診断時に記され、分類に使用した原発性疾患状態を記載する。報告された全ての併存症は、分類目的で無視した。

## 【0164】

試験番号2の研究設計および生体試料：10の異なる共同研究者からの2118試料を、2007年9月から2011年1月の間に試験番号2で免疫署名した。この治験で解析した血清銀行は、疾患、年齢、性別、民族性、報告された併存症あたりの患者数および“非疾患”コホートに貢献した対照数の点で本質的に不均衡である。技術的反復がピアソン相関係数 $< 0.85$ を有した独立したアレイは解析しなかった。残ったアレイをComBatを使用してアレイバッチバイアスについて解析した。1516個の試料がこの試験で有用であると見なされた。

20

## 【0165】

表3は試験番号2で使用した1516個の試料の詳細である。列1に挙げた各疾患状態について、利用可能な試料数を列2、疾患コホートに記載する。100倍再サンプリング方法は、トレーニングで使用するための各疾患の約1/4の試料を選択した。トレーニングコホートの平均および標準偏差を列3、トレーニングサイズに記載する。試料を患与された共同研究者の役職を列4、共同研究者に記載する。

30

## 【表 4】

表 3

疾患、状態	疾患コホート	トレーニングサイズ	共同研究者
健常対照	249	62 ± 4	UCI
対側乳癌	61	15 ± 1	BNI
乳癌ステージIIおよびIII	141	35 ± 3	ASU、FHCRC、UTSW、UCI
乳癌ステージIV	42	11 ± 1	UTSW
星状細胞腫	166	42 ± 3	Barrow Neurological Institute
多形神経膠芽腫	27	7 ± 1	ASU、BNI、CC、FHCRC、MSKCC、PCRT、UTSW、UCI、UPitt、UW
肺癌	107	25 ± 2	FHCRC
多発性骨髄腫	112	28 ± 2	MMRC
乏突起神経膠腫	48	12 ± 1	BNI
乏突起星細胞腫	97	25 ± 2	BNI
卵巣	86	22 ± 2	MS、MSKCC
膵炎	82	20 ± 1	CC、UW
膵癌	136	34 ± 3	CC、UW
ユーイング肉腫	20	5 ± 0	ASU
溪谷熱	142	36 ± 3	UA

10

20

## 【0166】

## 試験番号 1

試験番号 1 は、本発明の方法による複数の癌の同時の、高精度分類を示す。試験番号 1 は、複数採取場所からの同数のトレーニングおよび試験試料での制御された実験を記載する(表 2)。進行性膵癌(PC)、未処置多形神経膠芽腫(GMB)、食道腺癌(EC)、多発性骨髄腫(MM)およびステージIV乳癌(BC)の患者からの 20 の血清試料ならびに種々の場所で採取した 20 の混合した“非疾患”対照を試験した。

30

## 【0167】

トレーニングセットの全 120 試料での 2 回の技術的反復を通じた平均ピアソン相関係数は  $0.92 \pm 0.05$  であった。乳癌は最低平均反復相関(0.87)を示し、食道癌は最高(0.96)であった。各疾患と健常者の間の差異の強度および整合性を計測するために、我々は、 $N = 20$  の癌および  $N = 20$  の対照群の各々で一つずつ T 検定を行った。 $p < 9.6 \times 10^{-5}$  (1FP 許容)のペプチドの数を、表 4 に絶対最小 p 値と共に記載する。

40

## 【0168】

表 4 は、試験番号 1 ペプチドの T 検定統計解析結果を要約する。T 検定を使用して、20 個の対照に対して各疾患の 20 個のトレーニング試料を比較した。列 1 は疾患コホートを記載する。列 2 はペプチドの数を  $p$  値  $< 9.6 \times 10^{-5}$  (1FP / 10, 480 ペプチドに対応)と共に記載する。列 3 はその比較での最小 p 値である。列 4 は、少なくとも 1 個の他の疾患のペプチドと重複する上位 100 の最も有意なものからのペプチドの数である。乳癌は他の疾患との重複は無かったが、GMB は他の 3 疾患のペプチドと重複した。

## 【表 5】

表 4

疾患	$p < 9.6 \times 10^{-5}$ の ペプチド数	比較のための最小 p 値	共通ペプチド / 100
健常	NA	NA	NA
乳	608	$1.54 \times 10^{-14}$	0
食道	3103	$4.8 \times 10^{-25}$	14
GBM	3596	$9.05 \times 10^{-30}$	26
骨髄腫	4478	$3.52 \times 10^{-34}$	19
膵臓	1126	$3.67 \times 10^{-11}$	12

10

## 【0169】

T 検定で  $FWER = 5\%$  を有するペプチドのみを使用して、分類器としてサポートベクターマシン (SVM) を使用して疾患対健常の完全二進法分類が可能であった。しかしながら、これは複数疾患分類性能の問題には対応しなかった。表 4 の最右端列は、各疾患で最も有意な T 検定ペプチドの 100 個を比較したとき少なくとも 1 種の他の疾患と重複するペプチドの数である。ある疾患は、他のものよりペプチド重複が多かった。

## 【0170】

複数疾患の分類能を改善するために、重複特異性を有するペプチドにフィルターをかけた。第一に、ANOVA /  $FWER = 0.05\%$  をトレーニングセットに適応して、6 群の各々と総平均が有意に異なる 4,620 個のペプチドを同定した。第二に、GeneSpring 7.3.1 でのパターンマッチングを使用して、1 個を超える疾患で高シグナルのペプチドを除いた。計 120 個のペプチドの最終特徴集合のために疾患あたり 24 個のペプチドをこうして選択した。膵臓および乳癌は相対的に低い全体的シグナルを有し、食道および脳の癌ははるかに高いシグナルであったが、この選択方法は、分類器が強いシグナルおよび多くの有意なペプチドを有する疾患に圧倒されることを防いだ。トレーニングセットの一個抜き交差検証は、サポートベクターマシン (SVM) を使用したとき 2 個の誤割り当てを生じた。次いで、試験データセットをこれらの 120 個のペプチドを使用して分類し、表 5 に示すスコアとなった。

20

30

【表 6】

表 5

疾患(SVM)	乳癌(BC)	脳の癌(BC)	食道癌(EC)	多発性骨髄腫	非疾患	膵癌
乳癌	20	0	0	0	0	2
脳の癌	0	19	1	0	0	0
食道癌	0	0	19	0	0	0
多発性骨髄腫	0	1	0	20	0	0
非疾患	0	0	0	0	20	2
膵癌	0	0	0	0	0	16
感受性	1	0.95	0.95	1	1	0.80
特異性	0.98	0.99	1	0.99	0.98	1
PPV	0.91	0.95	1	0.95	0.91	1
NPV	1	0.99	0.99	1	1	0.96
有病率	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
検出率	0.17	0.16	0.16	0.17	0.17	0.13
検出有病率	0.18	0.17	0.15	0.18	0.18	0.13

10

20

## 【0171】

## アレイデータ解析

試験番号1について、3技術的反復を平均し、生物学的反復は平均しなかった。ピアソン相関係数  $> 0.85$  に達しなかった技術的反復を再処理した。データは線グラフへの描出のためにメディアン正規化され、 $\log_{10}$  変換された。分類のための最初のペプチドの選択はANOVAを使用して行い、5%に設定したファミリー基準過誤率(FWER)を使用してT検定を複数試験を補正した。ペプチドのさらなるフィルタリングを、類似性測度としてユークリッド距離/平均結合を用いてGeneSpringの“発現プロファイル”を使用して行った。このフィルターのために、各疾患群(疾患)を他の全疾患群(非疾患と累積的に呼ぶ)と比較した。疾患で一貫して高いシグナルかつ非疾患で一貫して低いシグナルのペプチドを選択し、疾患と非疾患の間のシグナル平均差が  $> 3$  倍であることを確実にした。多疾患分類のために、疾患辺り同数のペプチド(特性)が、高平均シグナルが特性選択にバイアスがかかることを妨げるが、分類性能がほぼ生の値に基づくことを確実にするために、さらなるデータ前処理は行わなかった。

30

## 【0172】

分類を、分類器としてサポートベクターマシン(SVM)を使用してR version 2.6.2で行った。サポートベクターマシン(SVM)を使用した試験番号1の誤分類スコアを表6に示す。真および偽判定を灰色領域で示し、性能統計を白色領域に示す。平均精度は0.95で、第95パーセンタイル値CI = 0.8943、0.9981、カッパ = 0.94であった。正確な判定は固有ベクトルにあり、ある群の何らかの誤割り当ては他群で偽陽性を与える。

40

【表 7】

表 6

疾患(S V M)	乳癌(B C)	脳の癌(B C)	食道癌(E C)	多発性骨髄腫	非疾患	膵癌
乳癌	20	0	0	0	0	2
脳の癌	0	19	1	0	0	0
食道癌	0	0	19	0	0	0
多発性骨髄腫	0	1	0	20	0	0
非疾患	0	0	0	0	20	2
膵癌	0	0	0	0	0	16
感受性	1	0.95	0.95	1	1	0.80
特異性	0.98	0.99	1	0.99	0.98	1
PPV	0.91	0.95	1	0.95	0.91	1
NPV	1	0.99	0.99	1	1	0.96
有病率	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
検出率	0.17	0.16	0.16	0.17	0.17	0.13
検出有病率	0.18	0.17	0.15	0.18	0.18	0.13

10

20

## 【0173】

図1は、ここに記載するクラスタリングおよび分類方法で決定した相対的群間および群内差の視覚表示を示す。図1に示す定量的差は表6に記載する。左上：PCAからの最初の主成分(分類するために使用せず、示すだけ)をX軸およびY軸にプロットする。試験データセットからの20試料を疾患で標識する：BC = 乳癌；EC = 食道癌；N = 正常ドナー；PC = 膵癌；MM = 多発性骨髄腫；およびBrC = GMB脳の癌。右上：LDAからの最初の2個の線形判別子を、X軸およびY軸に上記の疾患略語を用いプロットした。左した：選択で残ったサポートベクターの2個をX軸およびY軸にプロットする。右下：2個の単純ベイズ予測変数をX軸およびY軸にプロットする。

30

## 【0174】

図2は、ノードを概算するためにユークリッド距離と平均結合を使用した対立階層的クラスタリングを使用した120ペプチド(Y軸)および120患者(X軸)のヒートマップを示す。

## 【0175】

この階層は、有色系統樹を左に明示的に示す。ペプチドのk平均法クラスタリング(k = 5群、1 ~ Vに番号付け)の結果を各ヒートマップの左に示す。非癌対照を非疾患ペプチドの選択に使用せず、それゆえに、5群のペプチドと6群の患者がある。パネルAは、120種の選択された特性を使用するトレーニングデータ集合のヒートマップを示す。パネルBは、同じ120個のペプチドを使用してクラスター化した非混合試験データを示す。注：ペプチド群番号はk平均法に従うが、ペプチドを最クラスター化した。

40

## 【0176】

## 試験番号2

試験番号2は、免疫署名が、乳癌の3サブタイプを含む14種の疾患を分類できるかを試験した。1536試料を使用して、一連の255の差別的なペプチドを製造した。交差検証試験において、免疫署名は98%正確であった。表3は、試験番号2で解析した1516試料コホートで使用した試料を記載する。表4に記載するとおり、100個のT検定ペプチドを各疾患対対照群で選択した。

## 【0177】

50

試験番号2について、分類性能の非バイアス評価をするための再サンプリング方法を使用した。次の工程を100回繰り返し、結果は100トレーニング/試験反復の平均である。第一に、各疾患について「25%±7%の試料を補充せずに除き、特性選択のトレーニングに使用した。特性選択は、各回正確に255総ペプチドを選択した。コホートサイズの7%偏差は疾患有病率および/または試料利用能の自然の偏差を模倣する。交差検証を、トレーニングから選択した255特性を使用する残った~75%の試料の分類により実施した。第95パーセンタイル値信頼区間を全統計学的評価から計算した。試験番号2は、試験番号1で実行されたとおりサポートベクターマシン(SVM)を使用した。

【0178】

表7は、100回再サンプリングおよび最解析からの第95パーセンタイル値信頼区間と共にLDA、NBおよびSVM分類の結果を示す。予測を、予測疾患が他の疾患カテゴリーの予測として現れたならば偽陽性と判定し、正確なカテゴリーを誤ったならば偽陰性と判定した。試験番号1の高い精度を考えると、高い固有の患者変動性を伴うさらに小さなコホートでも、直線状超平面(これはいずれかのトレーニング点からその平面への距離を最適化する)を使用して、正確な免疫署名を可能にする。

【表8】

表7

疾患/(LDA)	精度	感受性	特異性	PPV	NPV
対側BC	97.8±0.14	69.1±2.82	99.21±0.1	81.05±3.46	98.48±0.11
星状芽細胞腫	96.93±0.17	90.1±1.3	97.82±0.17	83.79±3.46	98.73±0.18
BC	99.51±0.05	99.71±0.2	99.49±0.08	95.45±0.68	99.97±0.18
BC IVa	99.62±0.06	89.85±1.49	100±0	100±0	99.6±0.06
GBM	99.18±0.1	94.33±2	99.25±0.09	62.1±4.24	99.92±0.03
肺	99.02±0.12	92.37±0.58	99.59±0.09	94.79±1.27	99.35±0.05
MM	98.72±0.11	100±0	98.62±0.12	85.13±1.13	100±0
ND	96.62±0.17	85.45±0.77	99.31±0.1	96.66±0.47	96.6±0.23
乏突起神経膠腫	99.65±0.17	92.57±1.95	99.86±0.03	95.21±1.19	99.78±0.06
乏突起星細胞腫	98.94±0.15	98.45±0.82	98.95±0.12	86.41±1.78	99.91±0.04
卵巣	99.92±0.03	100±0	99.91±0.03	98.67±0.47	100±0
膵炎	99.67±0.05	95.42±1	99.91±0.03	98.5±0.54	99.74±0.05
PC	97.69±0.11	86.61±1.39	98.79±0.08	87.22±1.19	98.67±0.12
肉腫	98.81±0.11	54.15±5.48	99.67±0.07	71.55±5.65	99.12±0.12
VF	99.67±0.08	100±0	99.64±0.09	96.87±0.74	100±0
合計	98.77±0.04	89.87±1.32	99.33±0.08	88.89±1.59	99.33±0.07

【表 9】

疾患/(NB)	精度	感受性	特異性	PPV	NPV
対側BC	96±0.16	56.07±1.46	99.46±0.07	90.37±11.68	96.31±0.15
星状芽細胞腫	91.92±0.23	91.96±1.25	91.91±0.25	31.39±10.61	99.66±0.06
BC	98.78±0.07	97.75±0.46	98.91±0.12	90.55±9.81	99.73±0.06
BC IVa	99.4±0.09	84.48±2.05	100±0	100±0	99.38±0.09
GBM	96.08±0.1	43.19±2.17	99.72±0.05	88.81±16.61	97.04±0.19
肺	99.08±0.1	92.4±0.89	99.74±0.06	97.32±6.18	99.25±0.08
MM	96.45±0.15	81.51±2.07	97.76±0.14	75.72±11.16	98.38±0.2
ND	95.84±0.17	93.18±0.62	96.41±0.18	83.88±7.21	98.54±0.14
乏突起神経膠腫	98.54±0.14	74.38±2.24	99.94±0.03	98.56±5.95	98.85±0.09
乏突起星細胞腫	97.75±0.15	86.11±0.86	98.72±0.13	84.75±13.01	99.87±0.04
卵巣	99.79±0.05	98.48±0.43	99.9±0.03	98.81±3.75	99.45±0.11
膵炎	99.3±0.11	92.27±1.49	99.8±0.05	97.4±5.82	97.13±0.17
PC	95.91±0.2	78.67±0.96	98.26±0.09	85.62±7.73	96.69±0.21
肉腫	96.73±0.2	25.21±1.44	100±0	100±0	99.73±0.07
VF	97.96±0.22	97.48±0.6	97.99±0.22	84.63±12.45	98.57±0.12
合計	97.35±0.15	79.52±1.27	98.57±0.1	87.19±8.13	98.57±0.12

10

20

【表 10】

疾患/(SVM)	精度	感受性	特異性	PPV	NPV
対側BC	98.89±0.03	91.04±0.59	99.19±0.04	81.16±8.55	99.65±0.03
星状芽細胞腫	97.12±0.06	84.11±0.31	98.93±0.03	91.96±2.18	97.82±0.06
BC	99.78±0.02	99.39±0.13	99.82±0.02	98.4±1.34	99.93±0.01
BC IVa	99.89±0.02	96.26±0.75	100±0	100±0	99.88±0.02
GBM	99.08±0.03	100±0	99.07±0.03	46.42±21.1	100±0
肺	99.73±0.02	96.82±0.18	99.97±0.01	99.65±1.12	99.73±0.02
MM	99.58±0.01	99.89±0.08	99.55±0.01	94.7±1.19	99.99±0.01
ND	98.13±0.07	91.33±0.35	99.7±0.02	98.6±0.81	98.03±0.09
乏突起神経膠腫	99.82±0.01	94.76±0.3	99.96±0.01	98.67±3.38	99.85±0.01
乏突起星細胞腫	99.29±0.03	100±0	99.24±0.03	89.66±4.09	100±0
卵巣	99.92±0.01	98.7±0.1	100±0	100±0	99.92±0.01
膵炎	99.73±0.02	96.27±0.27	99.94±0.01	99.07±1.58	99.77±0.02
PC	98.62±0.03	90.98±0.21	99.45±0.02	94.74±2.16	99.02±0.02
肉腫	99.19±0.04	100±0	99.18±0.03	38.81±31.06	100±0

30

40

【0179】

低い信頼区間は直線状の確率的分類器も、多数の不均衡群または多数のペプチド特性に特にバイアスがかかっていないことを示す。試験番号1と同様、各群と正常試料の分離は

50

SVMで見られた。T検定ペプチドからの重複は、少なくとも1種の他の疾患と重複する少なくとも1個および平均15個のペプチドを生じた。少なくとも1種の他の疾患と重複する少なくとも1個のペプチドを含んでいなかったT検定ペプチドの組はなかった。

【0180】

表8の値は、各分類器(PCA、NBおよびLDAおよびk-NN)で行った実際の判定である。判定を予測(列ヘッダー)対真の疾患(行)に、列1、行1がPCA分類器により正確に識別された判定数を含むように記載する。列1、行2は、乳癌(BC)を脳の癌(BrC)として識別した分類器の回数を含む。重度の矛盾判定をした分類アルゴリズムがなかったこと示すために、この表に多くの分類器を含ませる。

【表11】

表8

疾患/(PCA)	BC	BrC	EC	MM	ND	PC
乳癌	15	0	1	1	8	2
脳の癌	0	7	0	5	1	3
食道癌	0	0	14	2	5	0
多発性骨髄腫	2	11	3	11	0	5
非疾患	3	0	1	1	5	3
膵癌	0	2	1	0	1	7
感受性	0.75	0.35	0.70	0.55	0.25	0.35
特異性	0.88	0.91	0.93	0.79	0.92	0.96
PPV	0.56	0.44	0.67	0.34	0.38	0.64
NPV	0.95	0.88	0.94	0.90	0.86	0.88
有病率	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
検出率	0.13	0.06	0.12	0.09	0.04	0.06
検出有病率	0.23	0.13	0.18	0.27	0.11	0.09

10

20

30

【表 1 2】

疾患/(NB)	BC	B r C	EC	MM	ND	PC
乳癌	13	0	0	0	0	0
脳の癌	0	19	0	4	0	0
食道癌	0	0	20	0	9	0
多発性骨 髄腫	0	1	0	16	0	0
非疾患	0	0	0	0	10	1
膵癌	7	0	0	0	1	19
感受性	0.65	0.95	1	0.80	0.50	0.95
特異性	1	0.96	0.91	0.99	0.99	0.92
PPV	1	0.83	0.69	0.94	0.91	0.70
NPV	0.93	0.99	1	0.96	0.91	0.99
有病率	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
検出率	0.11	0.16	0.17	0.13	0.08	0.16
検出有病 率	0.11	0.19	0.24	0.14	0.09	0.23

10

20

【表 1 3】

疾患/(LDA)	BC	B r C	EC	MM	ND	PC
乳癌	20	0	0	0	1	3
脳の癌	0	16	0	1	0	0
食道癌	0	0	20	0	0	0
多発性骨 髄腫	0	4	0	19	0	0
非疾患	0	0	0	0	19	2
膵癌	0	0	0	0	0	15
感受性	1	0.80	1	0.95	0.95	0.75
特異性	0.96	0.99	1	0.96	0.98	1
PPV	0.83	0.94	1	0.83	0.91	1
NPV	1	0.96	1	0.99	0.99	0.95
有病率	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
検出率	0.17	0.13	0.17	0.16	0.16	0.13
検出有病 率	0.20	0.14	0.17	0.19	0.18	0.13

30

40

【表 1 4】

疾患/(k-NN)	BC	B r C	EC	MM	ND	PC
乳癌	20	0	0	0	0	4
脳の癌	0	17	0	0	0	0
食道癌	0	0	20	0	0	0
多発性骨髄腫	0	3	0	20	0	0
非疾患	0	0	0	0	20	3
膵癌	0	0	0	0	0	13
感受性	1	0.85	1	1	1	0.65
特異性	0.96	1	1	0.97	0.97	1
PPV	0.83	1	1	0.87	0.87	1
NPV	1	0.97	1	1	1	0.93
有病率	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.11
検出率	0.17	0.14	0.17	0.17	0.17	0.11
検出有病率	0.20	0.14	0.17	0.19	0.19	0.11

10

20

## 【0181】

図3は、1516患者試料にわたる255個の分類器ペプチドを示すヒートマップであり、コホートサイズを括弧内に示す。色は高い(赤色)から低い(青色)強度を示し、両ペプチド(Y軸および患者(X軸)の階層的クラスタリングに残るパターンは、疾患コホート内およびコホート間にわたる相対的差の可視化を助ける。併存症があることが分かっている患者を除外せず、対照試料は高度に多様なシグナルを示す。

## 【0182】

図4は、255個の分類器ペプチドから選択した選択ペプチドの行動を示す。あるペプチドは、特定の癌に高度に選択的であり、分類精度に完全に貢献する。多くのペプチドは、疾患内の一貫性が不完全であった。1個を超える疾患に高いペプチドもあった。別の受信者動作特性(ROC)曲線を描き、曲線下面積(AUC)値を各分類アルゴリズムに対して各疾患毎に計算した。SVMのAUC灰色で示す。パネルAは、乳癌についてのROC曲線のグラフ表示である。パネルBは、脳の癌についてのROC曲線のグラフ表示である。パネルCは、食道癌についてのROC曲線のグラフ表示である。パネルDは、多発性骨髄腫についてのROC曲線のグラフ表示である。パネルEは、健常対照についてのROC曲線のグラフ表示である。パネルFは、膵癌についてのROC曲線のグラフ表示である。

30

## 【0183】

図5はグラフ表示試験番号1の受信者動作特性(ROC)曲線のグラフ表示である。PCAの曲線下面積(AUC)を灰色で示す。

40

## 【0184】

図6は試験番号1の受信者動作特性(ROC)曲線のグラフ表示である。NBの曲線下面積(AUC)を灰色で示す。

## 【0185】

図7は試験番号1の受信者動作特性(ROC)曲線のグラフ表示である。LDAの曲線下面積(AUC)を灰色で示す。

## 【0186】

図8は試験番号1の受信者動作特性(ROC)曲線のグラフ表示である。k-NNの曲線下面積(AUC)を灰色で示す。

## 【0187】

50

図9は、PCA、LDA、NBおよびk-NNの4分類器の要約であり、これは、SVMについて図1におけるような関連分類性能の図示的説明を提供できる。パネルAはPCAのグラフ表示であり、最初の2個の主成分をプロットする。パネルBはLDAのグラフ表示であり、X軸およびY軸は、上位2個の線形判別子を示す。パネルCはNBのグラフ表示であり、予測変数をプロットする。パネルDはk-NNのグラフ表示であり、グループワイズ距離をプロットする。

【0188】

図10は試験番号2からの255個の分類器ペプチドのうち3個の線グラフである。この強度プロファイルは、X軸に個々を示し、Y軸に各ペプチドについて空間および $\log_1$ 強度で分けた疾患を示す。特異性の3例を示す。パネルAは、疾患6および9について高く、他に対して低いペプチドの線グラフを示す。これは、他の9疾患に対する特異性を増強するが、疾患6と9の誤った解釈の可能性をもたらす。パネルBは、疾患11に対して他の疾患より平均9倍高い、ペプチドを示す。疾患3、5および6は高偏差であるが、疾患11は高度に一貫し、疾患11に対する特異性を高める。パネルCは、疾患1および疾患9の一部に対して高いペプチドを示す。コホートで違うが、疾患特異的であるペプチドは、この疾患の特異性に悪影響はないが、感受性に影響し得る。疾患1内の相対的に高いシグナルを考慮して、このペプチドは、疾患9のみの区別には中程度にしか成功しないが、疾患2~8および10~11に対する識別は極めて成功する。

【0189】

健康モニタリング方法、診断方法、処置方法および予防医療方法としての免疫署名

疾患の診断、健康モニタリング、処置および予防が立ち向かう困難さは、試料コホート変動性、異なる採血法および試料の凍結-融解サイクルへの承伏である。試験番号1および試験番号2は、本発明がこれらの困難性に打ち勝つことができることを示し、試験番号1および試験番号2は、本発明の方法での広範な対象の高い状態分類特異性を示した。試験番号1および試験番号2はまた免疫署名が高体積試料処理に使用できることも示し、発見相でのより多くの疾患および対照試料を可能にする。この免疫署名の特性は、標準的バイオマーカー発見の共通課題である過剰適合に打ち勝つことができる。

【0190】

試験番号1および試験番号2は、免疫署名が標準的トレーニング、盲検式試験アッセイにおける、種々のタイプの癌の高精度分類が可能な方法として示す。アレイにおけるペプチドの数の変動、アレイにおけるペプチド近接の最適化およびアレイにおける分子タイプの変動により、免疫署名を、健康の多数の異なる状態の健康モニタリング、診断、処置および予防の強力な方法とする。

【0191】

実施例2：免疫署名システムで用いるためのコンピューターアーキテクチャ

本発明のアレイで検出されたデータを、種々のコンピューターアーキテクチャを有する複数のコンピューターで解析できる。図11は、本発明の例示態様と組み合わせて使用できるコンピューター・システム1100のアーキテクチャの第一例を示すブロック図である。図11に示すとおり、コンピューター・システム例は、処理指示のためのプロセッサ1102を含み得る。プロセッサの非限定的例は、Intel Core i7<sup>TM</sup>プロセッサ、Intel Core i5<sup>TM</sup>プロセッサ、Intel Core i3<sup>TM</sup>プロセッサ、Intel Xeon<sup>TM</sup>プロセッサ、AMD Opteron<sup>TM</sup>プロセッサ、Samsung 32-bit RISC ARM 1176JZ(F)-S v1.0<sup>TM</sup>プロセッサ、ARM Cortex-A8 Samsung S5PC100<sup>TM</sup>プロセッサ、ARM Cortex-A8 Apple A4<sup>TM</sup>プロセッサ、Marvell PXA 930<sup>TM</sup>プロセッサまたは機能的に同等なプロセッサを含む。複数スレッド実行を平行処理のために使用できる。ある態様において、複数プロセッサまたは複数コアのプロセッサを、一コンピューター・システムであれ、クラスターであれ、複数のコンピューター、携帯電話および/または携帯用情報端末デバイスを含むネットワーク上のシステムに分散されていても、使用できる。

【0192】

データ獲得、処理および保存

図 1 1 に示すとおり、高速キャッシュ 1 1 0 1 をプロセッサ 1 1 0 2 に接続するかまたは組み込み、最近またはしばしばプロセッサ 1 1 0 2 により使用されている指示用高速記憶またはデータを得る。プロセッサ 1 1 0 2 をプロセッサバス 1 1 0 5 によりノースブリッジ 1 1 0 6 に接続する。ノースブリッジ 1 1 0 6 を、記憶バス 1 1 0 4 により即時呼び出し記憶装置 (RAM) 1 1 0 3 に接続し、プロセッサ 1 1 0 2 による RAM 1 1 0 3 へのアクセスを管理する。ノースブリッジ 1 1 0 6 をまたチップセットバス 1 1 0 7 によりサウスブリッジ 1 1 0 8 に接続する。サウスブリッジ 1 1 0 8 を、次に周辺バス 1 1 0 9 に接続する。周辺バスは、例えば、PCI、PCI-X、PCI Express または他の周辺バスであり得る。ノースブリッジおよびサウスブリッジはしばしばプロセッサチップセットと呼ばれ、プロセッサ、RAM および周辺バス 1 1 0 9 上の末端コンポーネントの間のデータ移送を管理する。あるアーキテクチャにおいて、別のノースブリッジチップを使用する代わりに、ノースブリッジの機能性を、プロセッサに組み込む。

10

#### 【0193】

ある態様において、システム 1 1 0 0 は、周辺バス 1 1 0 9 に連結したアクセレレーターカード 1 1 1 2 を含み得る。アクセレレーターは、ある処理を加速するためのフィールドプログラマブルゲートアレイ (FPGA) または他のハードウェアを含み得る。

#### 【0194】

#### ソフトウェアインターフェイス

ソフトウェアおよびデータは、外部記憶装置 1 1 1 3 に保存でき、プロセッサが使用するために RAM 1 1 0 3 および / またはキャッシュ 1 1 0 1 にロードできる。システム 1 1 0 0 は、システムリソースを管理するためのオペレーティングシステムを含み、オペレーティングシステムの非限定的例は、Linux、Windows™、MAC OS™、BlackBerry OS™、iOS™ および他の機能的に同等なオペレーティングシステム、ならびにオペレーティングシステムのトップで起動できるアプリケーションソフトウェアを含む。

20

#### 【0195】

本例において、システム 1 1 0 0 は、分散された平行処理に使用できるネットワーク接続記憶装置 (NAS) および他のコンピューター・システムのような外部記憶装置へのネットワークインターフェイスを提供するために周辺バスに接続したネットワークインターフェイスカード (NIC) 1 1 1 0 および 1 1 1 1 も含む。

30

#### 【0196】

#### コンピューター・システム

図 1 2 は、複数のコンピューター・システム 1 2 0 2 a および 1 2 0 2 b、複数の携帯電話および携帯用情報端末 1 2 0 2 c およびネットワーク接続記憶装置 (NAS) 1 2 0 1 a および 1 2 0 1 b を有するネットワーク 1 2 0 0 を示す略図である。ある態様において、システム 1 2 0 2 a、1 2 0 2 b および 1 2 0 2 c はデータ記憶装置を管理し、ネットワーク接続記憶装置 (NAS) 1 2 0 1 a および 1 2 0 1 b に保存されたデータへのデータアクセスを最適化する。数学的モデルをデータに対して使用でき、コンピューター・システム 1 2 0 2 a および 1 2 0 2 b および携帯電話および携帯用情報端末システム 1 2 0 2 c の間の分散された平行処理を使用して表かできる。コンピューター・システム 1 2 0 2 a および 1 2 0 2 b および携帯電話および携帯用情報端末システム 1 2 0 2 c は、ネットワーク接続記憶装置 (NAS) 1 2 0 1 a および 1 2 0 1 b に保存されたデータの適応データ再構築のための平行処理も提供する。図 1 2 は例として示すのみであり、多種多様な他のコンピューターアーキテクチャおよびシステムを本発明の種々の態様と組み合わせで使用できる。例えば、ブレードサーバを使用して、平行処理を提供できる。プロセッサブレードをバックプレーンを通して接続して、平行処理を提供する。記憶装置もバックプレーンにまたはネットワーク接続記憶装置 (NAS) として別のネットワークインターフェイスを通して接続できる。

40

#### 【0197】

ある態様において、プロセッサは別の記憶空間を維持し、データを他のプロセッサによる平行処理のためにネットワークインターフェイス、バックプレーンまたは他のコネ

50

クターをとおして伝達する。ある態様において、プロセッサの一部または全てが、共有仮想アドレス記憶空間を使用できる。

【0198】

#### 仮想システム

図13は、共有仮想アドレス記憶空間を使用するマルチプロセッサコンピュータ・システムのブロック図である。本システムは、共有記憶サブシステム1302にアクセスできる複数のプロセッサ1301a~fを含む。本システムは、複数のプログラマブルハードウェア記憶アルゴリズムプロセッサ(MAP)1303a~fを記憶サブシステム1302内に組み込む。各MAP1303a~fはメモリ1304a~fおよび1個以上のフィールドプログラマブルゲートアレイ(FPGA)1305a~fを含む。MAPは、設定可能機能ユニットおよび特定のアルゴリズムを提供するかまたはアルゴリズムの一部を各プロセッサと緊密な連携で処理のためにFPGA1305a~fに提供できる。本例において、各MAPはこれらの目的でプロセッサ全てに広くアクセス可能である。一つの配置において、各MAPは、連結したメモリ1304a~fにアクセスするための直接メモリアクセス(DMA)を使用でき、各マイクロプロセッサ1301a~fと独立したそして非同期的なタスク実行を可能にする。この配置で、MAPはアルゴリズムの連続送信および平行実行のために他のMAPに直接結果を送ることができる。

10

【0199】

上記コンピュータアーキテクチャおよびシステムは単なる例であり、多種多様な他のコンピュータ、携帯電話および携帯用情報端末アーキテクチャおよびシステムを本実施例態様で使用でき、一般的プロセッサ、コプロセッサ、FPGAおよび他のプログラマブルロジカル・デバイス、システムオンチップ(SOC)、特定用途向け集積回路(ASIC)および他の処理および論理素子の任意の組み合わせを使用するシステムを含む。あらゆる多様なデータ記憶装置メディアを実施例態様と組み合わせて使用でき、即時呼び出し記憶装置、ハード・ドライブ、フラッシュメモリ、テープドライブ、ディスクアレイ、ネットワーク接続記憶装置(NAS)および他の局所または分散されたデータ記憶装置デバイスおよびシステムを含む。

20

【0200】

例示的態様において、コンピュータ・システムは、上記のまたは他のコンピュータアーキテクチャおよびシステムのいずれかで実行するソフトウェアモジュールを使用して実施できる。他の態様において、システムの機能をファームウェア、プログラマブルロジカル・デバイス、例えば図13に示すフィールドプログラマブルゲートアレイ(FPGA)、システムオンチップ(SOC)、特定用途向け集積回路(ASIC)または他の処理および論理素子で部分的にまたは完全に実施できる。例えば、セットプロセッサおよびオペティマイザーを、図11に示すアクセレレーターカード1112のようなハードウェアアクセレレーターカードを介するハードウェア加速と共に実施できる。

30

【0201】

図14は、異なるペプチド密度の本発明のアレイの例を示す。上記コンピュータアーキテクチャのいずれも免疫署名検出、処理および解析に使用できる。

【0202】

#### 実施例3：状態の健康モニタリング方法、診断方法、処置方法および予防方法

対象の健康を、処置剤の投与前および投与後を含む、対象の生涯における複数の時点でモニタリングできる。次の実施例は、6名の対象の健康モニタリングにおける本発明の方法およびアレイの例の適用を記載する。ここに記載する実施例において、6名の対象の1名以上の状態の診断、処置、モニタリングおよび予防方法をペプチドアレイの例で試験した。本実施例に記載する実験は、約10,000ペプチドの特定のマイクロアレイで実施した。本発明のマイクロアレイのいずれも、本発明の方法と組み合わせて使用できる。

40

【0203】

#### 健康モニタリング

複数対象の健康を、対象をインフルエンザワクチン1回投与により処置する“前”およ

50

び“後”に追跡した。図15は、インフルエンザワクチン投与後長期間にわたる6名の対象の免疫署名プロファイルを示すヒートマップである。図15において、“前”はワクチン接種1~2週間前をいい、“後”はワクチン接種後21日間の6回の異なる時点の一つを示し得る。図15において、6名の対象の免疫署名結合パターンを次のとおり説明できる。1) 6名の非特定化された対象を番号112、113、33、43、73および84で示す。2) 免疫署名結合パターンをa) 対象112、“赤色タブ”、ワクチン接種前、1日目、5日目、7日目、14日目、21日目；b) 対象113、“緑色タブ”、ワクチン接種前、1日目、5日目、7日目、14日目、21日目；c) 対象33、“青色タブ”、ワクチン接種前、1日目、5日目、7日目、14日目、21日目；d) 対象43、“橙色タブ”、ワクチン接種前、1日目、5日目、7日目、14日目、21日目；e) 対象73、“薄桃色タブ”、ワクチン接種前、21日目；およびf) 対象84、“黄色タブ”、ワクチン接種前、1日目、5日目、7日目、14日目、21日目としてクラスター化する。

10

20

30

40

50

#### 【0204】

##### 生体試料タイプ

この実施例に記載する6名の対象の1名の体内の種々の源から生体試料を採取した。対象のうち1名の健康を1日、毎時モニタリングした。図16パネルAは、1日を通した同じ対象由来の異なる生体試料の免疫署名を示す。生体試料を2カ所の唾液の異なる源および静脈血の3箇所から得た。2カ所の唾液採取場所は：a) 耳下腺、“黄色タブ”でクラスター化；およびb) 下顎試料、“青色タブ”としてクラスター化であった。血液からの生体試料は、対象の静脈血由来である。パネルAは、11回の時点にわたる種々の生体試料のクラスタリングを示すヒートマップである。パネルBは、パネルAに示すヒートマップのある領域の高解像度解析である。パネルBは、10,000個のペプチドアレイにおける種々の生体試料のクラスタリングの差を示す。

#### 【0205】

生体試料のさらなる源を本発明のアレイおよび方法に使用でき、試験できる。

#### 【0206】

##### 予防医療

対象の1名の健康を、数ヶ月にわたり定期的に追跡した。この間、対象は、2010年11月25日の前に体調不良を報告した。図17は、数ヶ月にわたりモニタリングした対象の免疫署名結合パターンを示すヒートマップである。パネルAは2010年11月07日付近の対象の免疫署名結合パターンのピークを示す。パネルAの免疫署名結合パターンは、対象が症状を報告する前のピークと、その後の減少を示す。パネルBは、抗体の正常変動に入る疾患署名を有する全10,000個のペプチドにわたる一貫性を示す。これは、本発明の方法が、症状出現前に状態に関する免疫署名結合パターンを同定できることを示す。

#### 【0207】

症状出現前の状態と関係する結合パターンは、発症または状態進行を含む、状態の予防に使用できる。医師は、例えば、症状出現前に同定された状態を処置するための医薬を処方できるであろう。

#### 【0208】

##### アレイへの結合の異なるパターンの検出およびクラスタリング

1個を超える方法を、アレイへの生体試料の結合パターンの検出に適用できる。我々は、ここで、本発明のアレイへのIgMおよびIgG抗体の結合パターン検出への適用を示す。

#### 【0209】

対象のうち3名の健康を、本発明のアレイおよび方法でモニタリングした。3名の対象からのIgM抗体およびIgG抗体の結合のパターンの検出およびクラスタリングを、ペプチドアレイで解析した。図18は、21日間にわたる3名の対象の0日目、1日目、2日目、5日目、7日目および21日目の経時的免疫署名結合パターンを示すヒートマップ

である。パネルAは、IgM免疫グロブリンの結合を検出したときの約10,000個のペプチドのペプチドアレイのクラスタリングを示す。パネルBは、IgM免疫グロブリンを検出したときの50ペプチドのペプチドアレイのクラスタリングを示す。パネルCは、IgG免疫グロブリンの結合を検出したときの約10,000個のペプチドのペプチドアレイのクラスタリングを示す。パネルDは、IgG免疫グロブリンを検出したときの50ペプチドのペプチドアレイのクラスタリングを示す。IgM免疫グロブリンのペプチドアレイへの結合パターンを検出し、階層的距離を使用してクラスタ化したとき、10,000個のペプチド群のアレイは、採血した日に対応する正確なグループへの個々の対象の組織化ができなかった(パネルB)。アレイへのIgG免疫グロブリンの結合パターンを検出し、階層的距離を使用してクラスタ化したとき、対象の正体および採血日は正確にクラスタされた。パネルBについて、2方向ANOVA解析からの上位50ペプチドを示す。パネルCについて、2方向ANOVA解析からの上位50ペプチドを示す。各群は対象に対応する。

10

#### 【0210】

##### 健康モニタリング

対象のうち一人の健康を数ヶ月にわたり追跡した。図19は、免疫署名結合パターン解析した2名の対象の30日経時解析を示すヒートマップである。時間経過は、2名の対象の免疫署名結合プロファイルの年度毎のクラスタリングを含む。

#### 【0211】

対象の一人である対象84は、記載する時間経過の17日目に1回インフルエンザワクチンを受けた。図20は、22特異的ペプチド配列についての対象84の免疫署名結合プロファイルを示すヒートマップである。図20は、対象84の免疫署名結合プロファイルの年度毎のクラスタリングを含む。22ペプチドの配列は：配列番号1：CSGSYNM D K Y F T Y S W Y R E E R；配列番号2：CSGWDSFRHYERITDRHQGD；配列番号3：CSGRYFMHMEPTINHYYEGM；配列番号4：CSCVMM PDYRIHVHWSNWTG；配列番号5：CSGLRHYNVYDFRSNDRHWA；配列番号6：CSGVMAHTGHSGRMGPPDFQ；配列番号7：CSGNDHSQHDFAPVESYIMM；配列番号8：CSGILFFTTRETDVHYPANEG；配列番号9：CSGVDPWRSCHANQREYAJAN；配列番号10：CSGNGVHEFSAMLIMDMIIF；配列番号11：CSGIGDHMPLNEPNP L R D L K；配列番号12：CSGチアTNPLNVQYVMVQS；配列番号13：CSGTRKEHYLEHVAKHMEVW；配列番号14：CSGPTDITELMMRPKYSRIN；配列番号15：CSGDQQGTWGRVDMWSNRMH；配列番号16：CSGIMKRIHAQTMWYSPITD；配列番号17：CSGSFFFYVN K Q V N N K N Y Q T I；配列番号18：CSGLYAKQVA A Q R P I K Y W D H；配列番号19：CSGMMWYHGYPHVHANDAHW；配列番号20：CSGRYHPNYGDAKKHBM S R F；配列番号21：CSGHWKGD L R S G R H Y H H Q E F；および配列番号22：CSGEDTRRGHAWK F S E I S P Hである。

20

30

#### 【0212】

図21は、気管支炎診断後約20日間の対象84の血液試料の免疫署名結合プロファイルを示すヒートマップである。図21は、14の選択した本発明のペプチドに対する生体試料の結合パターンを示す。14ペプチドの配列は：配列番号23：CSGWVRKIL K K R I W T D P T N Y；配列番号24：CSGYPRSWFVY Y T P W K L F K G；配列番号25：CSGSHMQDIYRTVRS LGKSM；配列番号26：CSGVQLSSYTLKLGKVYQER；配列番号27：CSGKTMTTQWRSSLFKFAGM；配列番号28：CSGMKY N P F P K Y K S Y L Q Y V N；配列番号29：CSGISTKFWWK R N S I V F P K L；配列番号30：CSGTRGRWYDRRS P S K F L G Y；配列番号31：CSGQNVSAKYVKGRSVQSWI；配列番号32：CSGHI M G R K R H W P M S T S Y G V；配列番号33：CSGFNKPYV L K Y K M D T I H Y N；配列番号34：CSGYA Q V R Y A T R F W N K G K Y；

40

50

配列番号 35 : CSGWKHKYHKA A A Y F H K P F W ; および配列番号 36 : CSGWSKPHPKMIARNFFRHLである。

【0213】

図22は、図20で12/11/2011のインフルエンザと特徴づけられた対象の症状後診断を示すヒートマップである。図23は、肝炎ワクチン処置およびその3ヶ月後に最初のブースター処置を受けた対象の免疫署名結合パターンを示すヒートマップである。

【0214】

複数感染症の同時同定

図24は、本発明の方法およびアレイでの複数感染症の同定を示す。図24は、複数感染症の分類の要約を示す。パネルAは、デング、西ナイルウイルス(WNV)、梅毒、B型肝炎ウイルス(HBV)、正常血、溪谷熱およびC型肝炎ウイルスのクラスター化免疫署名結合プロファイルを示すヒートマップである。パネルBは、PCA分類のグラフ表示である。

10

【0215】

実施例4：免疫署名システム

次の実施例は、免疫署名用自動化システムを記載する。

【0216】

自動化システムは、数コンポーネント：1) 対象からの血液または唾液試料のような生体試料を入手し、記録し、希釈するための自動化システムを含む。自動化システムは、生体試料と本発明のペプチドマイクロアレイを接触させる。

20

【0217】

対象の免疫署名を、a) 希釈試料のペプチドアレイへの適用；b) 一定時間のインキュベーション；c) 試料の除去とアレイの洗浄；d) 二次抗体の一定時間の適用；e) 洗浄手順での未結合および/または過剰二次抗体の除去；およびf) 乾各スポットの蛍光を決定するためのアレイの乾燥および走査の自動化工程からなる対象の免疫署名アッセイにおいて得ることができる。図25は、本発明の免疫署名システムのコンポーネントの略図である。

【0218】

データ採取および解析

アレイをアラインし、標準的署名に対して署名を決定する。標準的署名は、健康対象の署名または未結合ペプチドの対照シグナルである。

30

【0219】

本発明のシステムで得た免疫署名に基づき、診断を提供できる

【0220】

図26パネルAはファージディスプレイライブラリーを示す。パネルAは、a) コンビナトリアル合成でのファージライブラリーの作製、b) ファージ-ディスプレイされた無作為抗原に対する血清のパンニングおよびc) 選択および配列決定の手順を示す。パネルBはペプチドマイクロアレイを示す。

【0221】

実施例5：ペプチドアレイ設計および製造

40

ペプチドアレイ製造に対する一連のマスクを次の基準に合うように設計した：

- ・ 18種アミノ酸使用
- ・ アレイに331,000個のペプチド
- ・ 各ペプチド10~16アミノ酸長
- ・ ペプチド配列を示される五量体の総数を最大化するように最適化した(配列多様性多様性を最大化する一方法として、できるだけ多くの多様な5アミノ酸配列を、アレイ上のペプチド配列に示す多)。
- ・ N末端に18種のアミノ酸のいずれか1個を有することが可能なペプチドは6%を超えない
- ・ ライブラリーは、90マスク(90リソグラフィ工程)を使用して製造することが可

50

能でなければならない。

【0222】

次の手順を実施した。

【0223】

大きなセット( $\sim 10^{10}$ )の16残基ペプチド配列を無作為数ジェネレーターで製造した。

【0224】

先に略記した(上記“アレイ製造”参照)このアプローチのコンピューターシミュレーションを使用して、 $10^{10}$ ペプチドセットのペプチドの各々のできるだけ多くの配列を、90リソグラフィ工程しか使用せずに製造した。

10

【0225】

シミュレーションした合成からのペプチド配列で、10~16アミノ酸の長さのペプチドのみを選択した。

【0226】

長さで選択したペプチドから、できるだけ多くの異なる五量体配列(5アミノ酸配列長)を含ませるために最適化したペプチドのサブセットを選択した。

【0227】

五量体選択したペプチドから、N末端アミノ酸組成が特定のアミノ酸のいずれかを6%までしか含まないペプチドを選択した。

20

【0228】

併せて、上記基準全てを満たすように選択した最終ペプチド配列群は331,000であった。

【0229】

図31のグラフは、上記のとおり選択したペプチド配列の長さの分布を示す。Y軸は特定の長さのペプチドの数である。この軸は0~100,000の範囲である。X軸はペプチドの長さをアミノ酸で示す。上記基準で要求されるように、全ペプチドは10~16アミノ酸であった。平均長は約11.5アミノ酸であった。

【0230】

図32に示すグラフは、3アミノ酸長、4アミノ酸長または5アミノ酸長である可能な配列の分布を示す。上の2個のグラフは、三量体配列(3アミノ酸長ペプチド)の分散を示す。 $18 \times 18 \times 18 = 5832$ 種の可能な三量体配列がある。左側は、上記のとおり選択したペプチドに対するこれらの三量体配列の集団分布を示す。右側は、無作為数ジェネレーターを使用して製造したペプチド配列のライブラリーに対する分布を示す。各グラフについて、X軸は、ライブラリーに特定の三量体配列が存在する回数を示す。Y軸は、X軸上に示された回数存在する三量体配列の数を示す。それゆえに、無作為数ジェネレーターを使用して製造されたペプチド配列について、5832の三量体配列ほぼ全てが、ライブラリーに400~600回現れることを示すことが読み取れる。左側の選択されたペプチドについて、対照的に、三量体配列の分布は広く、ある三量体配列は約100回しか存在せず、他のものは1000回を超えて存在する。全ての可能な三量体配列は、ライブラリーに複数回示される。

30

40

【0231】

中央のグラフは四量体配列(4アミノ酸配列)についてである。軸は三量体について記載したものに準じる。ほとんどの四量体配列が、無作為数ジェネレーターを使用して製造されたこのサイズのライブラリー(右パネル)で、約30回存在することが読み取れる。上記のとおり選択したペプチドライブラリー(左パネル)において、分布のピークは約20であり、無作為数ジェネレーターで製造した配列で見られるよりも幅が広い。 $18^4 = 104976$ の可能な四量体配列がある。全ての可能な四量体配列の99.99%が、上記のとおり選択したペプチドライブラリーに示される。

【0232】

下部グラフは五量体配列(5アミノ酸配列)についてである。軸は三量体について記載し

50

たとおりである。1, 8 8 9, 5 6 8の可能な五量体配列がある。上記のとおり選択したペプチド配列(左パネル)において、全ての可能な五量体配列の14%が示されていないことは注目に値する(これはグラフの最初の棒である)。五量体配列のほとんどが1回示され(2番目の棒)、少数が1回を超えて示される。纏めると、全ての可能な五量体配列の86%が選択ライブラリーに示される。対照的に、全五量体の約75%しか無作為数ジェネレーターを使用して製造したペプチド配列のライブラリーに示されない(右パネル)。無作為に作製した配列についての右のグラフの棒が、ライブラリーに示されない配列を表し、上記のとおり選択したペプチドについての左のグラフの最初の棒より大きいことが読み取れる。

#### 【0233】

図33は、上記のとおり選択したペプチドライブラリーについてのペプチドにおける位置の関数としてアミノ酸組成を示す。N末端は1位であり、C末端は10~16位である(上記のとおり、このライブラリーにおいてはペプチド長の分散がある)。これはX軸上に示す。Y軸は、X軸に示す位置で特定のアミノ酸を含むペプチドの比を示す。各線(各色)は18種のアミノ酸のうち一つを示す。N末端で、アミノ酸の2個が幾分低く示されていることが読み取れる(N末端にこれらのアミノ酸を含むペプチドの5%未満)。この配列のほとんどをとおして、アミノ酸組成はほぼ一定であり、平均5%より少し上である。これは、18アミノ酸の均一分散で期待されるものである( $1/18 = \sim 0.056$ )。C末端近位の逸脱も、この領域の長さが長くなるに連れてペプチド数が減るために起こる。

#### 【0234】

態様

次の非限定的態様は、本発明の説明用の例を提供するが、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【0235】

態様1. 健康モニタリング方法であって、a) 複合的生体試料をペプチドアレイと接触させ、ここで、該ペプチドアレイは該生体試料中の少なくとも1種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、b) 該抗体のペプチドアレイ中の複数の異なるペプチドとのオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成し、そしてc) 該免疫署名と健康状態を関連させることを含む、方法。

#### 【0236】

態様2. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが8~35残基長である、態様1に記載の方法。

#### 【0237】

態様3. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが15~25残基長である、態様1または2に記載の方法。

#### 【0238】

態様4. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが2~4nmの範囲の平均的間隙を有する、態様1~3のいずれかに記載の方法。

#### 【0239】

態様5. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが3~6nmの範囲の平均的間隙を有する、態様1~4のいずれかに記載の方法。

#### 【0240】

態様6. 異なるペプチドが分子に約 $10^3 \text{ M}^{-1}$ の結合定数で結合する、態様1~5のいずれかに記載の方法。

#### 【0241】

態様7. 異なるペプチドが分子に $10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ の範囲の結合定数で結合する、態様1~6のいずれかに記載の方法。

#### 【0242】

態様8. 異なるペプチドが分子に $2 \times 10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ の範囲の結合定数で結合する、態様1~7のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【0243】

態様9. 異なるペプチドが分子に  $10^4 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、態様1～8のいずれかに記載の方法。

## 【0244】

態様10. 異なるペプチドがペプチド模倣物を含む、態様1～9のいずれかに記載の方法。

## 【0245】

態様11. 異なるペプチドが無作為アミノ酸配列を有する、態様1～10のいずれかに記載の方法。

## 【0246】

態様12. 異なるペプチドが非天然アミノ酸を含む、態様1～11のいずれかに記載の方法。

## 【0247】

態様13. 処置を提供する方法であって、a) 対象から複合的生体試料を入手し、b) 該複合的生体試料をペプチドアレイと接触させ、ここで、該ペプチドアレイは該生体試料中の少なくとも1種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、c) 該抗体の複数の異なるペプチドへのオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成し、d) 該免疫署名と状態を関連させ、そしてe) 該状態に対する処置を提供することを含む、方法。

## 【0248】

態様14. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが8～35残基長である、態様13に記載の方法。

## 【0249】

態様15. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが15～25残基長である、態様13または14に記載の方法。

## 【0250】

態様16. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが2～4nmの範囲の平均的間隙を有する、態様13～15のいずれかに記載の方法。

## 【0251】

態様17. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが3～6nmの範囲の平均的間隙を有する、態様13～16のいずれかに記載の方法。

## 【0252】

態様18. 異なるペプチドが分子に約  $10^3 \text{ M}^{-1}$  の結合定数で結合する、態様13～17のいずれかに記載の方法。

## 【0253】

態様19. 異なるペプチドが分子に  $10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、態様13～18のいずれかに記載の方法。

## 【0254】

態様20. 異なるペプチドが分子に  $2 \times 10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、態様13～19のいずれかに記載の方法。

## 【0255】

態様21. 異なるペプチドが分子に  $10^4 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  の範囲の結合定数で結合する、態様13～20のいずれかに記載の方法。

## 【0256】

態様22. 異なるペプチドがペプチド模倣物を含む、態様13～21のいずれかに記載の方法。

## 【0257】

態様23. 異なるペプチドが無作為アミノ酸配列を有する、態様13～22のいずれかに記載の方法。

## 【0258】

態様24. 異なるペプチドが非天然アミノ酸を含む、態様13～23のいずれかに記載の

10

20

30

40

50

方法。

【0259】

態様25. 状態の予防方法であって、a) 対象から複合的生体試料を得て；b) 該複合的生体試料をペプチドアレイと接触させ、ここで、該ペプチドアレイは複合的生体試料中の少なくとも1種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、c) 該複合的生体試料の複数の異なるペプチドへのオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成し、d) 該免疫署名と状態を関連させ、そしてe) 該状態のための処置を入手することを含む、方法。

【0260】

態様26. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが8～35残基長である、態様25に記載の方法。 10

【0261】

態様27. ペプチドマイクロアレイ上の異なるペプチドが15～25残基長である、態様25または26に記載の方法。

【0262】

態様28. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが2～4nmの範囲の平均的間隙を有する、態様25～27のいずれかに記載の方法。

【0263】

態様29. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが3～6nmの範囲の平均的間隙を有する、態様25～28のいずれかに記載の方法。 20

【0264】

態様30. 異なるペプチドが分子に約 $10^3 \text{ M}^{-1}$ の結合定数で結合する、態様25～29のいずれかに記載の方法。

【0265】

態様31. 異なるペプチドが分子に $10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ の範囲の結合定数で結合する、態様25～30のいずれかに記載の方法。

【0266】

態様32. 異なるペプチドが分子に $2 \times 10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ の範囲の結合定数で結合する、態様25～31のいずれかに記載の方法。

【0267】

態様33. 異なるペプチドが分子に $10^4 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ の範囲の結合定数で結合する、態様25～32のいずれかに記載の方法。 30

【0268】

態様34. 異なるペプチドがペプチド模倣物を含む、態様25～33のいずれかに記載の方法。

【0269】

態様35. 異なるペプチドが無作為アミノ酸配列を有する、態様25～34のいずれかに記載の方法。

【0270】

態様36. 異なるペプチドが非天然アミノ酸を含む、態様25～35のいずれかに記載の方法。 40

【0271】

態様37. 診断方法であって、a) 対象から複合的生体試料を入手し、b) 該複合的生体試料をペプチドアレイと接触させ、ここで、該ペプチドアレイは該生体試料中の少なくとも1種の抗体とオフターゲット結合できる種々のペプチドを含み、c) 該複合的生体試料の一群の種々のペプチドへのオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成し、そしてd) 該免疫署名に基づき状態を診断することを含む、方法。

【0272】

態様38. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが8～35残基長である、態様37に記載の方法。 50

## 【0273】

態様39. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが15～25残基長である、態様37または38に記載の方法。

## 【0274】

態様40. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが2～4nmの範囲の平均的間隙を有する、態様37～39のいずれかに記載の方法。

## 【0275】

態様41. ペプチドアレイ上の異なるペプチドが3～6nmの範囲の平均的間隙を有する、態様37～40のいずれかに記載の方法。

## 【0276】

態様42. 異なるペプチドが分子に約 $10^3 \text{ M}^{-1}$ の結合定数で結合する、態様37～41のいずれかに記載の方法。

## 【0277】

態様43. 異なるペプチドが分子に $10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ の範囲の結合定数で結合する、態様37～42のいずれかに記載の方法。

## 【0278】

態様44. 異なるペプチドが分子に $2 \times 10^3 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ の範囲の結合定数で結合する、態様37～43のいずれかに記載の方法。

## 【0279】

態様45. 異なるペプチドが分子に $10^4 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ の範囲の結合定数で結合する、態様37～44のいずれかに記載の方法。

## 【0280】

態様46. 異なるペプチドがペプチド模倣物を含む、態様37～45のいずれかに記載の方法。

## 【0281】

態様47. 異なるペプチドが無作為アミノ酸配列を有する、態様37～46のいずれかに記載の方法。

## 【0282】

態様48. 異なるペプチドが一パラトープに結合する、態様37～47のいずれかに記載の方法。

## 【0283】

態様49. 固体支持体上の様々な位置に固定化された多様な長さの複数のインサイツ合成ポリマーを含むアレイであって、ポリマーのインサイツ合成が

a. 固体支持体上の位置の予定した画分に第一モノマーを付加し、

b. 固体支持体上の位置の予定した画分に第二モノマーを付加し、ここで、第二モノマーの位置の予定した画分は第一モノマーを含む位置およびモノマーがない位置を含み、

c. 固体支持体上の位置の予定した画分に第三モノマーを付加し、ここで、第三モノマーの位置の予定した画分は第一および第二モノマーを含む位置、第二モノマーを含む位置およびモノマーを含まない位置を含み、そして

d. ポリマーが所望の平均長に達し、画分の和が少なくとも計100%になるまで、定義された一連のモノマーを用いて手順a～cを繰り返す工程を含む、アレイ。

## 【0284】

態様50. 疑似無作為アレイである、態様49に記載のアレイ。

## 【0285】

態様51. 無作為アレイである、態様49に記載のアレイ。

## 【0286】

態様52. モノマーがアミノ酸、核酸およびペプチド核酸からなる群から選択される、態様49に記載のアレイ。

## 【0287】

10

20

30

40

50

態様 53. 定義された一連のモノマーにおけるモノマーが 1 回以上出現する、態様 49 に記載のアレイ。

【0288】

態様 54. 定義された一連のモノマーにおける異なるモノマーの数が少なくとも 2 である、態様 49 に記載のアレイ。

【0289】

態様 55. ポリマーが少なくとも 10 残基の平均長を有する、態様 49 に記載のアレイ。

【0290】

態様 56. ポリマーが少なくとも 12 残基の平均長を有する、態様 49 に記載のアレイ。

【0291】

態様 57. ポリマーが少なくとも 5 残基の平均長を有する、態様 49 に記載のアレイ。

【0292】

態様 58. ポリマーの少なくとも 5% が少なくとも 12 残基の長さを有する、態様 49 に記載のアレイ。

【0293】

態様 59. ポリマーが試料の成分に結合できる、態様 49 に記載のアレイ。

【0294】

態様 60. 画分の和が計 100% である、態様 49 に記載のアレイ。

【0295】

態様 61. 画分の和が 100% より大きい、態様 49 に記載のアレイ。

【0296】

態様 62. ポリマー数が 3,000 より大きい、態様 49 に記載のアレイ。

【0297】

態様 63. ポリマー数が 10,000 より大きい、態様 49 に記載のアレイ。

【0298】

態様 64. ポリマー数が 100,000 より大きい、態様 49 に記載のアレイ。

【0299】

態様 65. ポリマー数が 330,000 より大きい、態様 49 に記載のアレイ。

【0300】

態様 66. 固体支持体上の様々な位置に固定化された多様な長さの複数のインサイツ合成ポリマーを含むアレイを組み立てる方法であって、

a. ポリマーを合成する場所である固体支持体として基質を提供し、

b. 固体支持体上の位置の予定した画分に第一モノマーを付加し、

c. 固体支持体上の位置の予定した画分に第二モノマーを付加し、ここで、第二モノマーの位置の予定した画分は第一モノマーを含む位置およびモノマーがない位置を含み、

d. 固体支持体上の位置の予定した画分に第三モノマーを付加し、ここで、第三モノマーの位置の予定した画分は第一および第二モノマーを含む位置、第二モノマーを含む位置およびモノマーを含まない位置を含み、そして

e. ポリマーが所望の平均長に達し、画分の和が少なくとも計 100% になるまで、定義された一連のモノマーを用いて手順 b ~ d を繰り返す工程を含む、

方法。

【0301】

態様 67. 疑似無作為アレイである、態様 66 に記載の方法。

【0302】

態様 68. 疑似無作為アレイである、態様 66 に記載の方法。

【0303】

態様 69. 無作為アレイである、態様 66 に記載の方法。

【0304】

態様 70. モノマーがアミノ酸、核酸およびペプチド核酸からなる群から選択される、態様 66 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【0305】

態様71. 定義された一連のモノマーにおけるモノマーが1回以上出現する、態様66に記載の方法。

## 【0306】

態様72. 定義された一連のモノマーにおける異なるモノマーの数が少なくとも2である、態様66に記載の方法。

## 【0307】

態様73. ポリマーが少なくとも10残基の平均長を有する、態様66に記載の方法。

## 【0308】

態様74. ポリマーが少なくとも12残基の平均長を有する、態様66に記載の方法。 10

## 【0309】

態様75. ポリマーが少なくとも5残基の平均長を有する、態様66に記載の方法。

## 【0310】

態様76. ポリマーの少なくとも5%が少なくとも12残基の長さを有する、態様66に記載の方法。

## 【0311】

態様77. ポリマーが試料の成分に結合できる、態様66に記載の方法。

## 【0312】

態様78. 画分の和が計100%である、態様66に記載の方法。

## 【0313】

態様79. 画分の和が100%より大きい、態様66に記載の方法。 20

## 【0314】

態様80. ポリマー数が3,000より大きい、態様66に記載の方法。

## 【0315】

態様81. ポリマー数が10,000より大きい、態様66に記載の方法。

## 【0316】

態様82. ポリマー数が100,000より大きい、態様66に記載の方法。

## 【0317】

態様83. ポリマー数が330,000より大きい、態様66に記載の方法。

## 【0318】

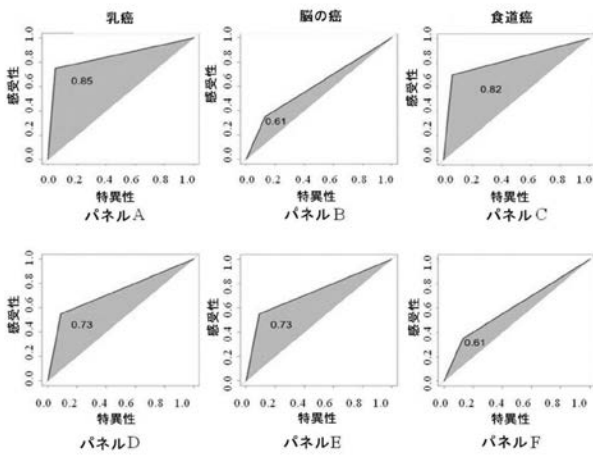
態様89. アレイを対象の健康状態をモニタリングに使用する方法であって、 30

- a) 複合的生体試料と態様49～65のいずれかに記載のペプチドアレイを接触させ；
  - b) 抗体の複数のペプチドアレイ中の異なるペプチドに対するオフターゲット結合を測定して免疫署名を形成させ；そして
  - c) 免疫署名と健康状態を関連させる
- 手順を含む、方法。



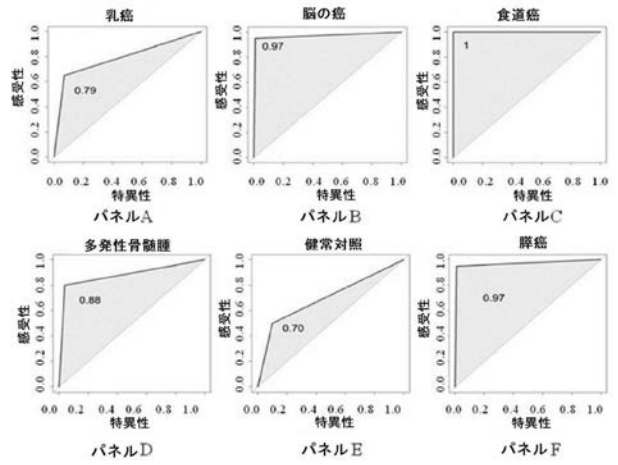
【 図 5 】

FIGURE 5



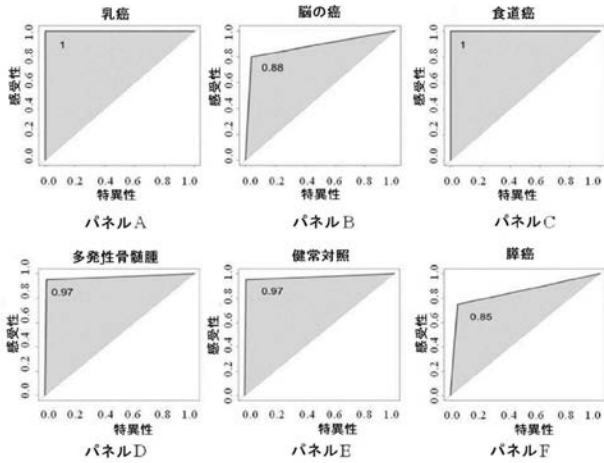
【 図 6 】

FIGURE 6



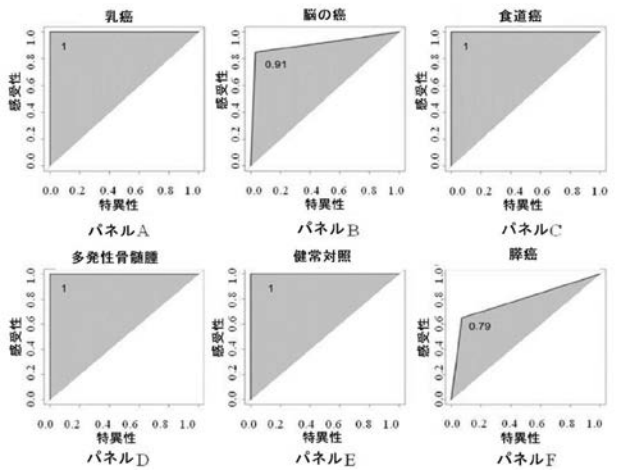
【 図 7 】

FIGURE 7



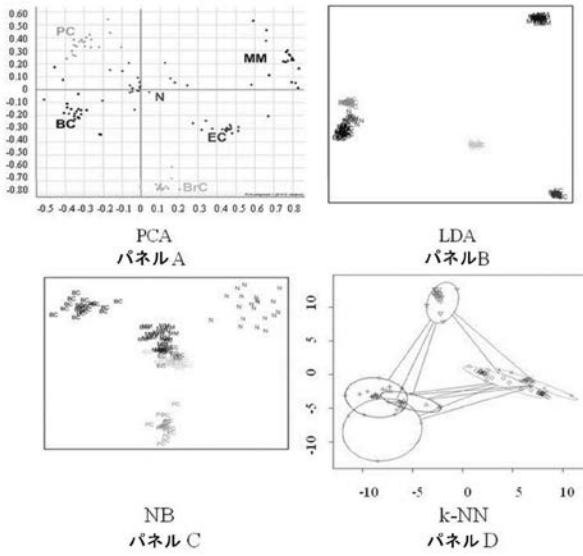
【 図 8 】

FIGURE 8



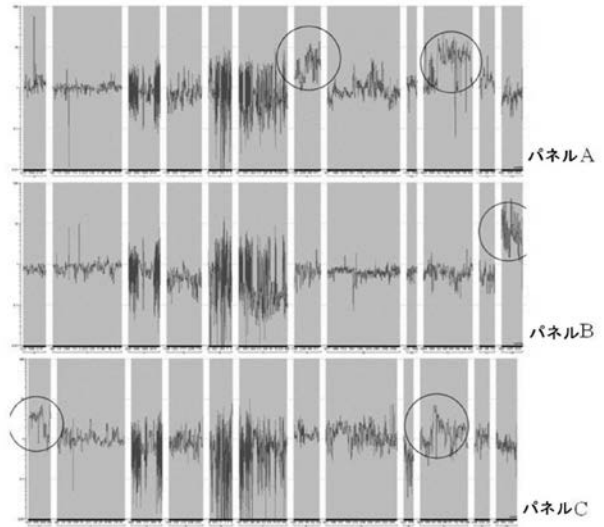
【 図 9 】

FIGURE 9



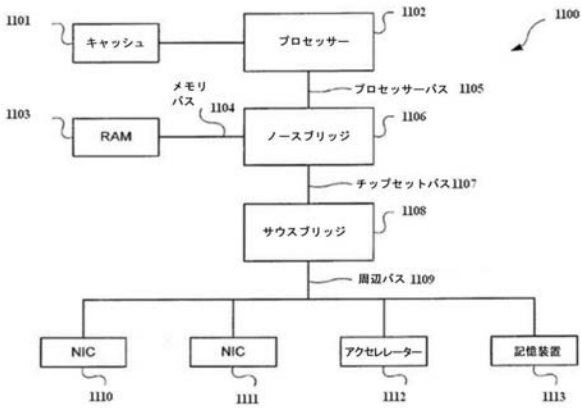
【 図 1 0 】

FIGURE 10



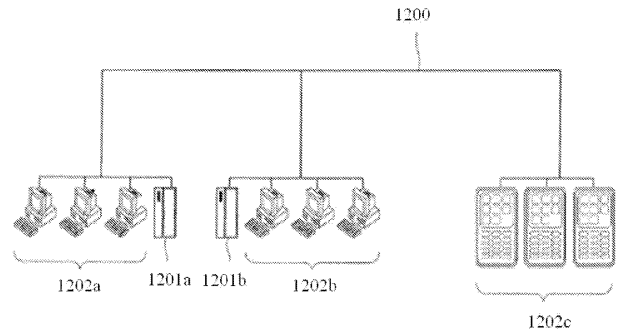
【 図 1 1 】

FIGURE 11



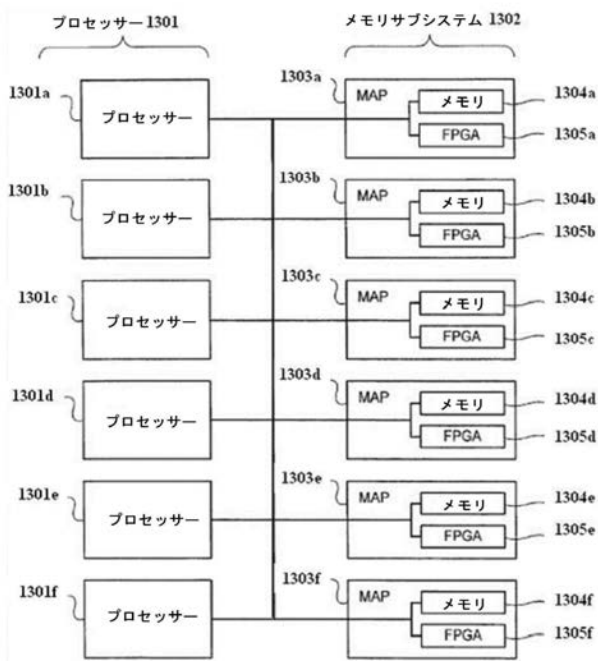
【 図 1 2 】

FIGURE 12



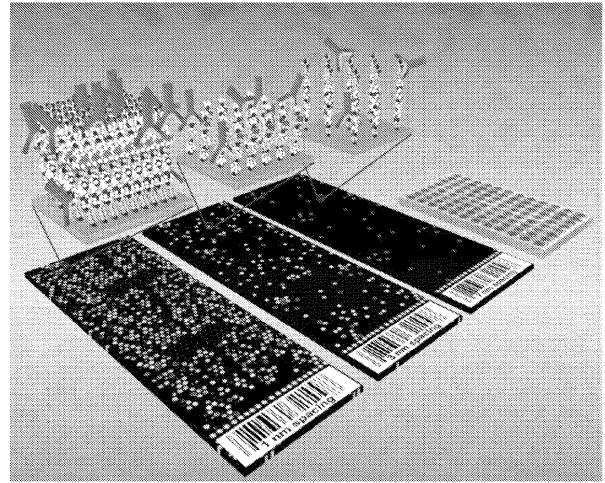
【 図 1 3 】

FIGURE 13



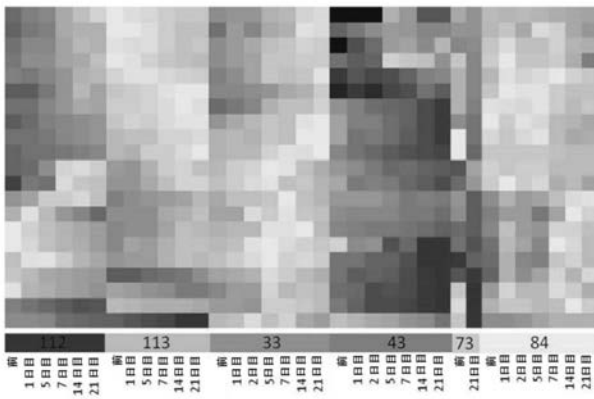
【 図 1 4 】

FIGURE 14



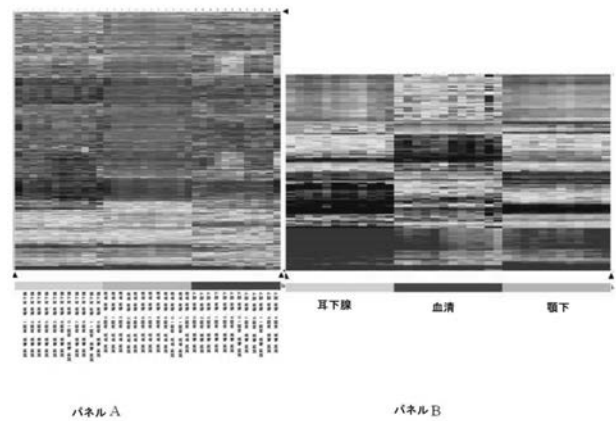
【 図 1 5 】

FIGURE 15



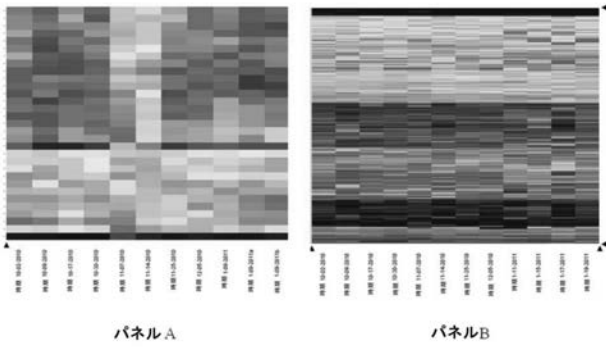
【 図 1 6 】

FIGURE 16



【 図 1 7 】

FIGURE 17

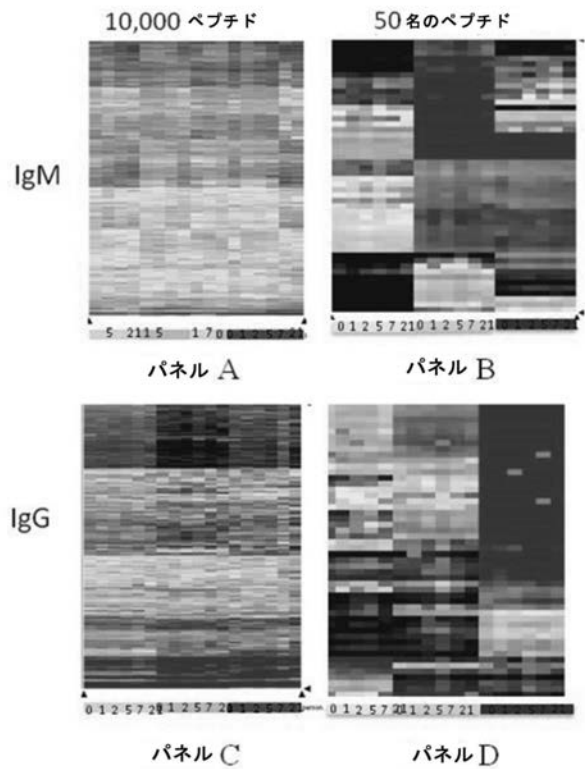


パネル A

パネル B

【 図 1 8 】

FIGURE 18



パネル A

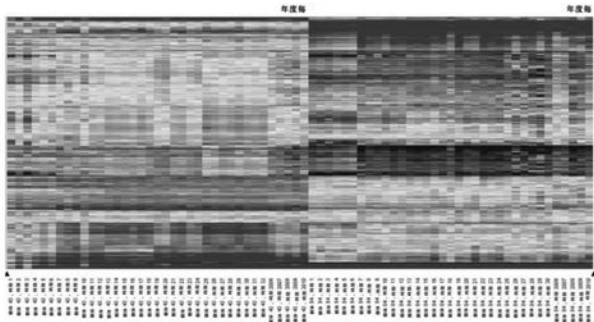
パネル B

パネル C

パネル D

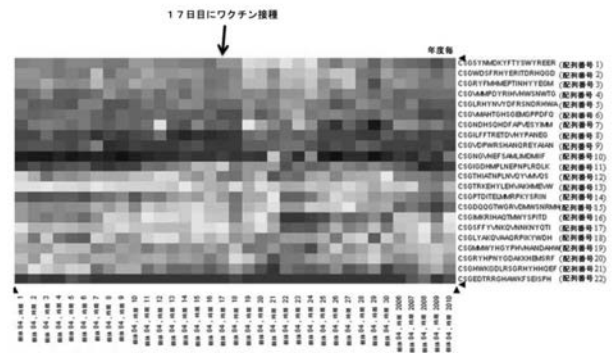
【 図 1 9 】

FIGURE 19



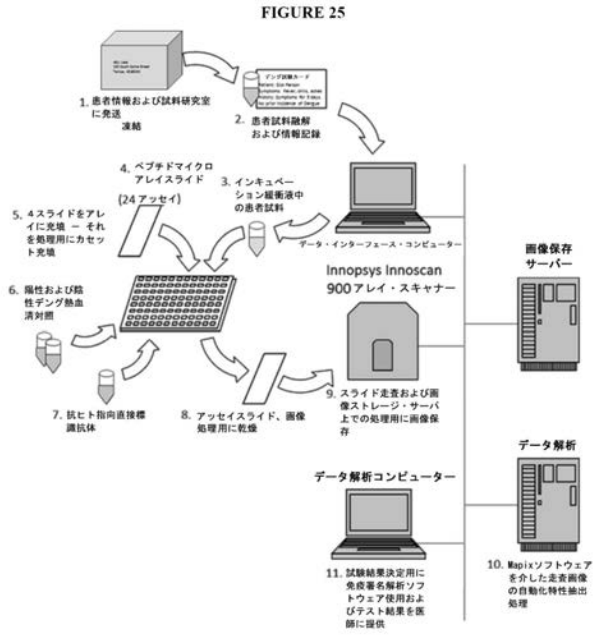
【 図 2 0 】

FIGURE 20

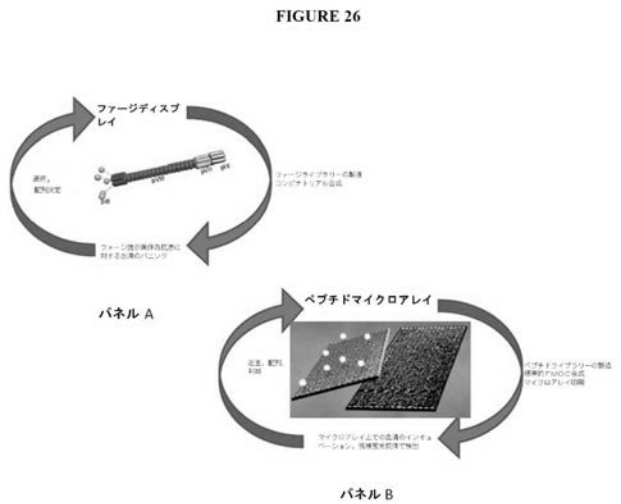




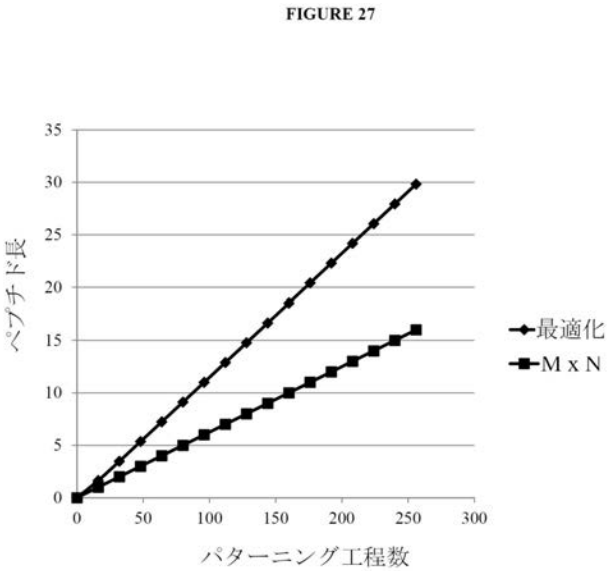
【 図 2 5 】



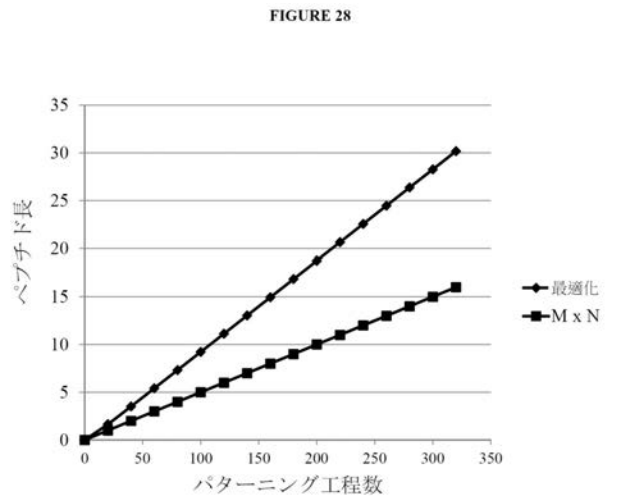
【 図 2 6 】



【 図 2 7 】

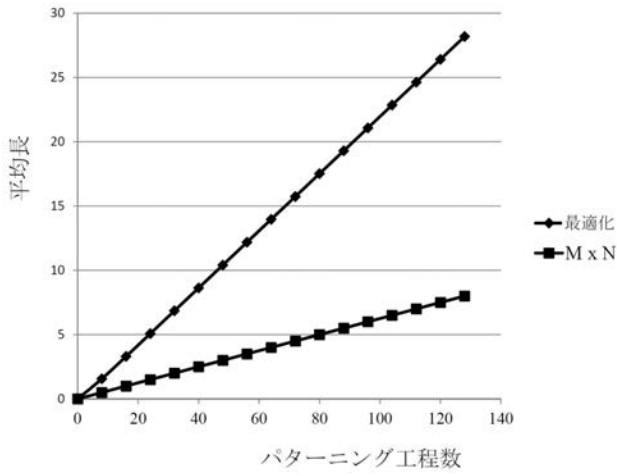


【 図 2 8 】



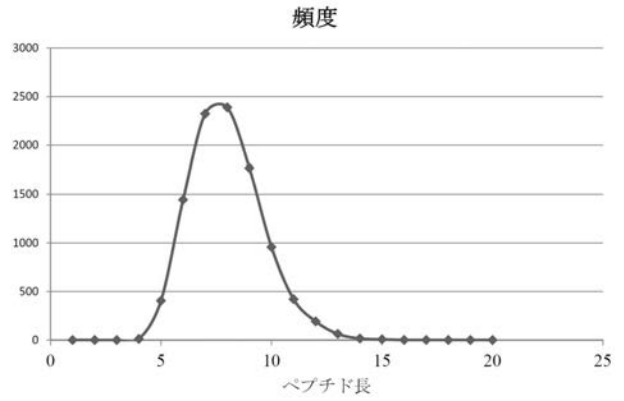
【 図 2 9 】

FIGURE 29



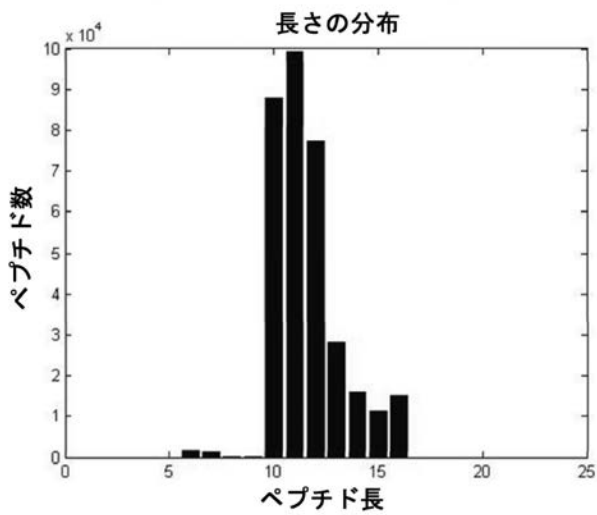
【 図 3 0 】

FIGURE 30



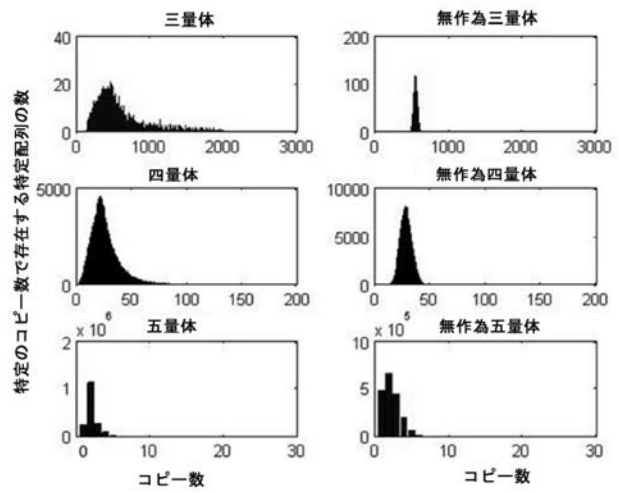
【 図 3 1 】

FIGURE 31



【 図 3 2 】

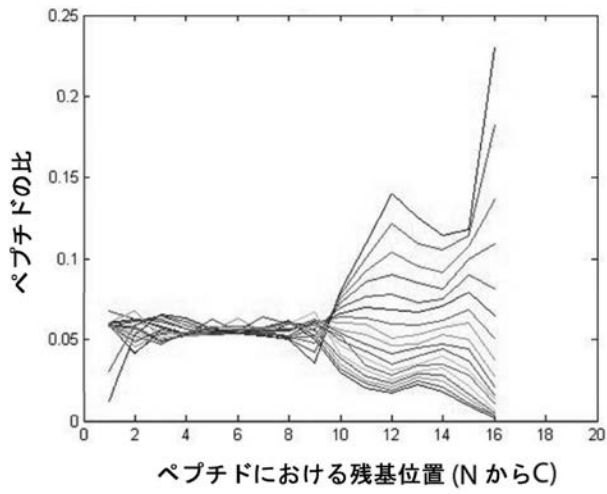
FIGURE 32



【図 3 3】

FIGURE 33

## アミノ酸組成対位置



## 【配列表】

2019012072000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成30年9月18日(2018.9.18)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

本願明細書、特許請求の範囲または図面に記載の発明。

## フロントページの続き

(71)出願人 514247702

アリゾナ ボード オブ リージェンツ ア ボディ コーポレート オブ ザ ステイト オブ  
アリゾナ アクティング フォー アンド オン ビハーフ オブ アリゾナ ステイト ユニ  
バーシティー

ARIZONA BOARD OF REGENTS, A BODY CORPORATE O  
F THE STATE OF ARIZONA ACTING FOR AND ON BEH  
ALF OF ARIZONA STATE UNIVERSITY

アメリカ合衆国 アリゾナ州 85257-3538 スコッツデール ノース スコッツデール  
ロード 1475 スカイ ソング スイート 200

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 スティーブン・アルバート・ジョンストン

アメリカ合衆国 85284 アリゾナ州テンピ、サウス・ドーシー・レイン 8606番

(72)発明者 フィリップ・スタッフォード

アメリカ合衆国 85044 アリゾナ州フェニックス、イースト・カチナ・ドライブ 3419番

(72)発明者 ニール・ウッドバリー

アメリカ合衆国 85282 アリゾナ州テンピ、イースト・ロマ・ビスタ・ドライブ 2053番

【外国語明細書】

2019012072000001.pdf

专利名称(译)	免疫特征：早期诊断和健康监测方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019012072A</a>	公开(公告)日	2019-01-24
申请号	JP2018153487	申请日	2018-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	亚利桑那板of摄政亚洲人体实业オブザ邦of亚利桑那演技andオンビハーフオブアリゾナスティートユニバーシティー米面		
申请(专利权)人(译)	亚利桑那板of摄政亚洲人体实业of the邦of亚利桑那演技米面and开ビハーフof亚利桑那邦ユニバーシティー		
[标]发明人	スティーブンアルバートジョンストン フィリップスタッフオード ニールウッドバリー		
发明人	スティーブン・アルバート・ジョンストン フィリップ・スタッフオード ニール・ウッドバリー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00 C40B40/10		
CPC分类号	G01N33/54306 B01J19/0046 B01J2219/00659 B01J2219/00722 B01J2219/00725 B01J2219/00729 B82Y5/00 B82Y15/00 B82Y30/00 G01N33/6845 G01N33/6854 G01N33/6893 G01N2410/00 G01N2800 /52 G01N2800/60		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N G01N33/53.D G01N37/00.102 C40B40/10 G01N33/53.NZN.A		
代理人(译)	阿依鸭毛 富田健二		
优先权	61/694598 2012-08-29 US		
其他公开文献	JP2019012072A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

需要解决的问题：为健康监测，诊断，治疗和预防医学提供有效的方法和阵列。用于监测健康的方法包括a)使复杂的生物样品与肽阵列接触，其中肽阵列包含能够与生物样品中的至少一种抗体脱靶的各种肽，b)测量与多肽抗体阵列中的不同肽的脱靶结合以形成免疫特征，和c)包括将免疫特征与健康状态相关联的程序。【选择图】无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特願2019-12072 (P2019-12072A) (43) 公開日 平成31年1月24日 (2019.1.24)
(51) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考)
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 ZNAN	
GO1N 37/00 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
C40B 40/10 (2006.01)	GO1N 37/00 102	
	C40B 40/10	
審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 71 頁)		
(21) 出願番号	特願2018-153487 (P2018-153487)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成30年8月17日 (2018.8.17)	アリゾナ ボード オブ リージェンツ ア ボディ コーポレート オブ ザ ス テイト オブ アリゾナ アクティング フォー アンド オン ビハーフ オブ アリゾナ ステイト ユニバーシティー ARIZONA BOARD OF RE GENTS, A BODY CORPO RATE OF THE STATE O F ARIZONA ACTING FO R AND ON BEHALF OF ARIZONA STATE UNIVE RSITY アメリカ合衆国 アリゾナ州 85257 -3538 スコットズゲール ノース ス 最終頁に続く
(62) 分割の表示	特願2015-530060 (P2015-530060) の分割	
原出願日	平成25年8月29日 (2013.8.29)	
(31) 優先権主張番号	61/694,598	
(32) 優先日	平成24年8月29日 (2012.8.29)	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	
(特許庁注：以下のものは登録商標) 1. TWEEN 2. Linux		
(54) 【発明の名称】 免疫署名：早期診断および健康モニタリングの方法		